

# Neue Charakterisierungsmethoden für Natriumcarboxymethylcellulosen



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Maria Shakun  
aus Volozin, Weißrussland

Referent:	Prof. Dr. Matthias Rehahn
Korreferent:	Prof. Dr. Markus Biesalski
Tag der Einreichung:	28. Oktober 2014
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Januar 2015

Darmstadt 2015

D17

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

M. Shakun, H. Maier, Th. Heinze, P. Kilz, W. Radke, *Molar mass characterization of sodium carboxymethyl cellulose by SEC-MALLS*. Carbohydrate Polymers, 2013, 95: p. 550 – 559.

M. Shakun, Th. Heinze, W. Radke, *Determination of the DS distribution on non-degraded sodium carboxymethyl cellulose by gradient chromatography*. Carbohydrate Polymers, 2013, 98: p. 943 – 950.

W. Radke, *Polymer separations by liquid interaction chromatography: principles – prospects – limitations*. J. Chromatogr. A, 2014, 1335: p. 62 – 79.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Cellulose	1
1.2 Synthese und Eigenschaften von Natriumcarboxymethylcellulosen	3
1.3 Molekulare Heterogenität von Natriumcarboxymethylcellulosen und ihr Einfluss auf einige Produkteigenschaften	5
1.4 Analytische Charakterisierung der molekularen Heterogenität von NaCMCn, Stand der Forschung	11
<b>2 MOTIVATION DER ARBEIT UND ZIELSETZUNG</b>	<b>18</b>
<b>3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>20</b>
3.1 Grundlagen der Flüssigchromatographie von Polymeren	20
Größenausschlusschromatographie	21
Adsorptionschromatographie	30
Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption	33
3.2 Kopplung der Chromatographie mit der FTIR-Spektroskopie	34
3.3 Grundlagen der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie	36
3.4 Verwendete Ionenchromatographiemechanismen zur Trennung von monomeren Carboxymethylglucosen	41
Anionenaustauschchromatographie	41
Ionenausschlusschromatographie	42
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>44</b>
4.1 Charakterisierung der Molekulargewichtsverteilung von NaCMCn mittels SEC-MALLS	44
Auswahl der mobilen Phase	44
Bestimmung der Wiederfindungen der Proben nach der Filtration	47
Auswahl geeigneter Probenkonzentration	48
Bestimmung der Wiederfindungen der Proben nach der SEC-Trennung	51
SEC-Elutionskurven	53
Einfluss des DS und des Salzes auf das Brechungsindexinkrement $dn/dc$	55
Bestimmung der Referenz- $M_w$ in wässriger NaCl-Lösung	56
Bestimmung der $M_w$ in wässriger $NH_4OAc$ -Lösung	57
SEC-MALLS-Kalibrierkurven	57
Skalierungsverhalten der NaCMCn	61
Korrekturfaktoren zur Umrechnung einer pullulanbasierten Kalibrierkurve	62
4.2 Trennung von NaCMCn nach der chemischen Zusammensetzung (DS)	65
Auswahl geeigneter stationärer und mobiler Phasen	66
Optimierung der Trennung durch Variation des pH-Wertes	74
Optimierung der Trennung nach DS durch die Veränderung der Gradientensteilheit	79
Bestimmung der DS-Verteilungen von NaCMC-Proben und Quantifizierung der chemischen Heterogenität 1. Ordnung	82

Gradiententrennungen technischer NaCMC-Proben .....	89
<b>4.3 Charakterisierung der Gradientenfraktionen.....</b>	<b>91</b>
4.3.1. Versuche zur Charakterisierung der Gradientenfraktionen mittels HPLC nach vollständigem Kettenabbau .....	92
Aufbau einer HPLC-Methode nach vollständigem Kettenabbau für die Originalproben .....	92
Versuche zur Übertragung der aufgebauten HPLC-Methode nach vollständigem Kettenabbau auf die Gradientenfraktionen .....	103
4.3.2 Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie .....	107
Erstellung einer Kalibrierkurve zur Bestimmung von DS.....	112
Bestimmung des DS-Verlaufes über die Polymerpeaks in der Gradientenchromatographie .....	116
<b>4.4 Charakterisierung der NaCMCn durch zweidimensionale Flüssigchromatographie .....</b>	<b>123</b>
Auswahl geeigneter Probenmengen und Flussraten .....	124
Zweidimensionale Trennungen der individuellen Proben .....	128
Zweidimensionale Trennungen der Probenmischungen .....	135
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>141</b>
<b>6 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>145</b>
<b>6.1 Allgemeines über Proben und andere verwendete Stoffe.....</b>	<b>145</b>
Probenherstellung.....	145
Probencharakterisierung durch die Hersteller .....	146
<b>6.2 SEC-MALLS.....</b>	<b>147</b>
<b>6.3 Gradientenchromatographie .....</b>	<b>150</b>
<b>6.4 HPLC nach vollständigem Kettenabbau .....</b>	<b>152</b>
Standardhydrolyse .....	152
Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse durch SEC .....	153
Trennung der Hydrolysate mittels Anionenaustauschchromatographie .....	153
Trennung der Hydrolysate mittels Ionenausschlusschromatographie .....	153
MALDI-TOF/MS .....	153
<b>6.5 Online Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie.....</b>	<b>154</b>
<b>6.6 2D-Chromatographie von NaCMCn .....</b>	<b>155</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>157</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>160</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>165</b>

# 1 EINLEITUNG

Nachwachsende Rohstoffe finden ein stetig wachsendes Interesse, vor allem da sie die immer knapper werdenden fossilen Rohstoffen teilweise ersetzen können. Daneben besitzen nachwachsende Rohstoffe wichtige Vorteile, wie die ökologisch wichtige CO<sub>2</sub>-Neutralität, die Möglichkeit zur Herstellung von biobasierten, biologisch abbaubaren und/oder biokompatiblen Polymeren oder die Gewinnung von Chemikalien mit definierter stereochemischer Struktur, die auf der Basis fossiler Rohstoffe nur schwer zugänglich sind.

Eine der wichtigsten Klassen der nachwachsenden Rohstoffe bilden Kohlenhydrate. Der Hauptvertreter der Kohlenhydrate, die Cellulose, ist seit jeher ein wichtiges Nutzmaterial (Holz, Textilien). Durch die Möglichkeit ihrer chemischen Derivatisierung nimmt sie auch als industrieller Rohstoff einen wichtigen Platz in der Wirtschaft ein.

## 1.1 Cellulose

Cellulose ist der Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände. Ihr Anteil in natürlichen Quellen variiert von 25 – 30 % in Moosen, 20 – 40 % in grünen Algen, 40 – 50 % in Holz und bis hin zu 90 – 99 % in Baumwolle [1]. Cellulose kommt zusammen mit Hemicellulosen (in Baumwolle) und auch Lignin (in Holz) vor. Sie wird durch körpereigene Enzyme des menschlichen Intestinaltrakts nicht angegriffen und bildet zusammen mit den anderen genannten inerten Polysacchariden den als Rohfaser bezeichneten Ballaststoffanteil von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft (Gemüse, Obst, Getreide). Cellulose ist die mengenmäßig häufigste organische Verbindung der Erde und damit auch das häufigste Polysaccharid.

Cellulose ist ein unverzweigtes lineares Polysaccharid, in welchem mehrere hundert bis zehntausend  $\beta$ -D-Anhydroglucoseeinheiten (AGU) 1,4- $\beta$ -glykosidisch miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 1) [1, 2].

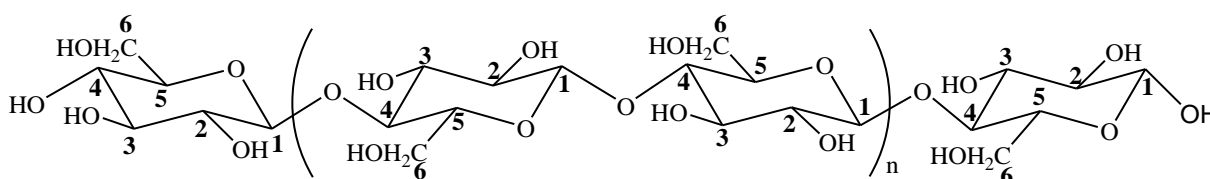


Abb. 1: Aufbau einer Cellulosekette.

Jede AGU ist gegenüber den beiden benachbarten AGUs um ca.  $180^\circ$  entlang der Längsachse der Polymerkette verdreht, so dass streng genommen Cellobiose (Disaccharid) als Monomer der Cellulose angesehen werden kann. Cellulose besitzt zwei nicht äquivalente Kettenenden. Während die Hemiacetalgruppe an einem Kettenende (in Abb. 1 rechts) als eine reduzierende Gruppe gilt, ist die gegenüberliegende Seite nicht reduzierend [1].

Native Cellulose kristallisiert monoklin, wobei die in Faserrichtung angeordneten Ketten die b-Achse der Elementarzelle bilden (Cellulose I) (Abb. 2) [2].

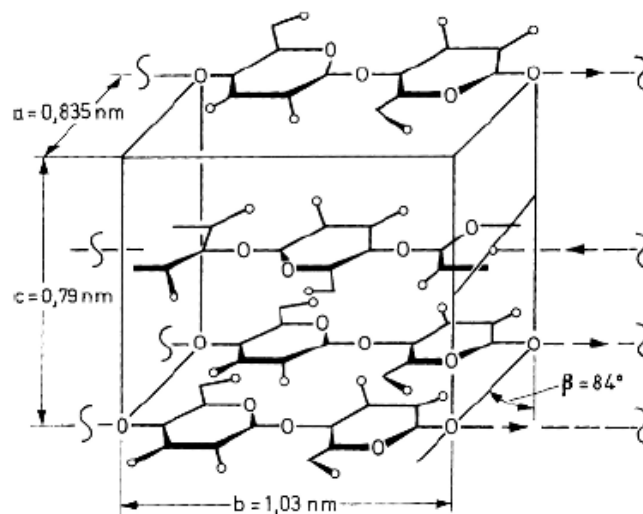


Abb. 2: Elementarzelle der Cellulose.

Die Ketten sind wahrscheinlich gefaltet, so dass sich intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen O-4 und O-6 sowie zwischen O-3 und O-5 bilden können. In Richtung der a-Achse liegen intermolekulare Wasserstoffbrücken vor, in Richtung der c-Achse hydrophobe Wechselwirkungen. Der Anteil kristalliner Abschnitte beträgt bei nativer Cellulose im Durchschnitt 60 %. Diese werden durch amorphe Abschnitte unterbrochen.

Cellulose ist hochmolekular und polydispers [1], wobei je nach Herkunft Polymerisationsgrade von 300 bis 27000 angegeben werden. Bei den Prozessen, die bei der Cellulosegewinnung durchlaufen werden – Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, partielle Hydrolyse, Lösen und Wiederausfällen – kann es zum partiellen Abbau kommen.

Aufgrund des hohen Molekulargewichtes und der hochgeordneten Struktur ist Cellulose in Wasser und den meisten gängigen organischen Lösungsmitteln unlöslich. Auch das Quellungsvermögen, das in Abhängigkeit von der Herkunft schwankt, ist gering [2]. Für das

Auflösen von Cellulose ist das Aufbrechen sowohl inter- als auch intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen von primärer Bedeutung, welches mit den üblichen Lösungsmitteln nicht gelingt. Zum Lösen von Cellulose wurden spezielle Lösungsmittelsysteme entwickelt, von denen die meisten niedermolekulare Salze oder ionische Gruppen enthalten. Z.B. wird N-Methylmorpholin-N-oxid industriell zur Gewinnung von Cellulosefasern im sogenannten Lyocell-Prozess genutzt [3]. Außerdem sind N,N-Dimethylacetamid/Lithiumchlorid (DMAc)/LiCl und Dimethylsulfoxid (DMSO)/Tetrabutylammoniumfluoridtrihydrat (TBAF) [3, 4] als Lösungsmittel für Cellulose bekannt. In der Vergangenheit wurden auch geschmolzene Salzhydrate wie  $\text{LiX} \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{X} = \text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) [3, 4] benutzt. Neuerdings kommen beim Lösen von Cellulose ionische Flüssigkeiten wie 1-N-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ( $[\text{C}_4\text{mim}]^+\text{Cl}^-$ ) zum Einsatz [3]. Alle genannten Lösungsmittel lösen Cellulose ohne Veränderung der chemischen Zusammensetzung. Es handelt sich also um nicht derivatisierende Lösungsmittel.

Die nahezu völlig inerte Cellulose kann auch auf einem anderen Weg in lösliche oder quellbare Form gebracht werden – durch ihre Derivatisierung. Mit Ausnahme der AGUs an den beiden Kettenenden enthält jede AGU-Einheit der Cellulose drei Hydroxylgruppen, jeweils eine an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 (siehe Abb. 1). Diese können in verschiedenste Ether- und Esterderivate umgewandelt werden. Die Ether- und Estersubstituenten bewirken eine Störung der regelmäßigen Packung der Celluloseketten unter partiellem Aufbrechen der innerhalb und zwischen den Ketten vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen. Hierdurch wird die Solvatisierung erleichtert. Ein solches Etherderivat ist die Natriumcarboxymethylcellulose (NaCMC).

## **1.2 Synthese und Eigenschaften von Natriumcarboxymethylcellulosen**

Natriumcarboxymethylcellulose wurde zum ersten Mal kommerziell im Jahr 1918 von der IG Farbenindustrie AG (Deutschland) produziert. Seitdem wurden der Herstellungsprozess und auch die Produktqualität ständig verbessert [4]. Heutzutage ist NaCMC mit einer jährlichen Produktion von rund 230 000 Tonnen [5] das am meisten produzierte Cellulosederivat. Vor allem aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und Polyelektrolyteigenschaften findet NaCMC vielfältige Anwendungen. In ihrer nicht gereinigten Form (NaCMC-Gehalt 55 – 85 %) wird sie hauptsächlich als Schmutzträger in Reinigungsmitteln und als Bohrspülhilfsmittel bei Erdölbohrungen eingesetzt. In einer Reinheit von ca. 98 % wird NaCMC für die

Papierherstellung und Oberflächenbeschichtungen verwendet. In ihrer hochreinen Form (NaCMC-Gehalt von mehr als 99.5 %) findet NaCMC in der pharmazeutischen, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie Verwendung. Hier wird sie z.B. als Basis für fettfreie Salben oder als Tablettensprengmittel eingesetzt. In Lebensmitteln dient NaCMC zur Verbesserung der Konsistenz, als Verdickungs-, Suspendier-, stabilisierendes und wasserbindendes Mittel und bietet einen kalorienarmen Ersatz für Stärke und Proteine [5].

Großtechnisch wird NaCMC überwiegend unter heterogenen Bedingungen hergestellt. Bei dem als Slurry-Verfahren oder konventionelle Synthese bekannten Verfahren wird Cellulose zunächst fein gemahlen und dann in wässrig-alkoholischer NaOH-Lösung (Slurrymedium) dispergiert, wobei die merzerisierte Cellulose entsteht. Diese wird dann durch Zugabe von Chloressigsäure oder ihres Natriumsalzes mittels einer Williamson-Ethersynthese zur NaCMC umgesetzt (siehe Abb. 3). Als Alkohole verwendet man Ethanol, tert-Butanol, Isopropanol oder deren Mischungen. Die Merzerisation wird bei Raumtemperatur und die Reaktion mit Chloressigsäure bei einer Temperatur zwischen 50 °C und dem Siedepunkt des Slurrymediums durchgeführt. Als Nebenprodukte können durch Hydrolyse der Chloressigsäure Glycolsäure und ihre Salze (Glucolate) entstehen [5]. Mit diesem einstufigen Verfahren können auch bei der Anwendung eines Chloressigsäure- bzw. Chloressigsäuresalzüberschusses maximal etwa die Hälfte aller in Cellulose vorhandenen Hydroxylgruppen substituiert werden. Es wird angenommen, dass dies auf die elektrostatische Abstoßung von NaCMC und dem Reagenz zurückzuführen ist [4]. Um höhere Substitutionsgrade zu erreichen wird daher eine mehrstufige Carboxymethylierung durchgeführt, in dem nicht die reine Cellulose, sondern die NaCMC als Ausgangsstoff eingesetzt wird.

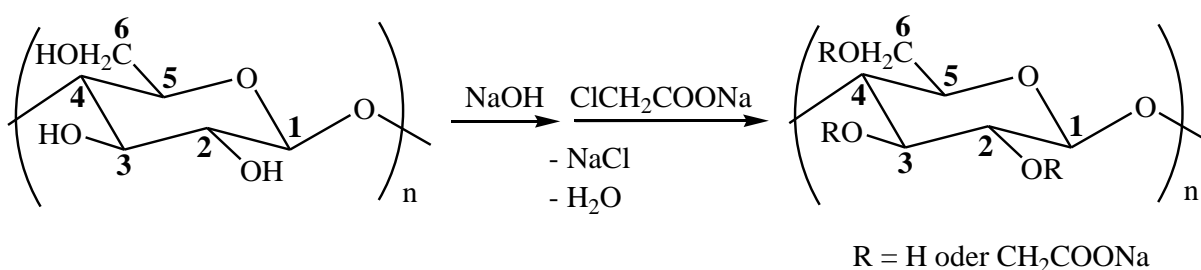


Abb. 3: Schematische Darstellung von NaCMC-Synthese (Slurry-Verfahren).

NaCMCn können auch unter homogenen Bedingungen hergestellt werden, wobei Cellulose erst in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. in DMAc/LiCl, DMSO/TBAF, ionische



Flüssigkeiten,  $\text{Ni}(\text{tris}(2\text{-aminoethyl})\text{amin})(\text{OH})_2$  gelöst, mit NaOH-Lösung oder mit festem NaOH aktiviert und dann mit dem Reagenz umgesetzt wird [3, 4, 6-8]. Diese Synthesen werden jedoch überwiegend für Forschungszwecke verwendet.

NaCMCn sind in der Regel erst ab einem bestimmten Substitutionsgrad wasserlöslich. Bei sehr kleinen Substitutionsgraden sind die intra- bzw. intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Ausgangscellulose nicht ausreichend aufgebrochen, was zu einem celluloseähnlichen Lösungscharakter dieser Produkte führt.

Die Carboxymethyl(CM)-Substituenten sind schwache Säuren. Bei niedrigen pH-Werten liegen sie in protonierter Form vor, wobei es zu Kettenvernetzungen und Ausbildung eines wasserunlöslichen Hydrogels aufgrund von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen kommt. Bei höheren pH-Werten, bei denen die Substituenten deprotoniert sind, besitzen NaCMCn typischen Polyelektrolytcharakter, welcher durch die elektrostatische Abstoßung gleichgeladener Gruppen der Polymerkette bestimmt wird. Dies spiegelt sich besonders im Viskositätsverhalten in salzfreien Lösungen (bei kleinen Ionenstärken) wieder. Während die Viskosität neutraler Polymerlösungen mit sinkender Polymerkonzentration nahezu linear abfällt, zeigen Polyelektrolytlösungen bei kleinen Konzentrationen einen Anstieg der Viskosität. Dies wird damit erklärt, dass mit sinkender Konzentration die Ionenstärke der Lösung abnimmt, wodurch die Ladungen an den Polymerketten schlechter abgeschirmt werden und sich gegenseitig abstoßen. Hierdurch nimmt die Polymerkette mehr und mehr eine gestreckte Form an, was den Viskositätsanstieg der Lösung bewirkt. Bei hohen Ionenstärken der NaCMC-Lösungen allerdings, z.B. beim Vorliegen einer hinreichend hohen Konzentration eines niedermolekularen Salzes, werden die Ladungen an den Polymerketten der NaCMC ausreichend abgeschirmt, so dass das Viskositätsverhalten von NaCMC dem neutraler Polymere ähnelt [9].

### **1.3 Molekulare Heterogenität von Natriumcarboxymethylcellulosen und ihr Einfluss auf einige Produkteigenschaften**

Wie aus Abb. 1 deutlich wird, besitzt jede AGU der Cellulose drei Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 (im Weiteren als O-2, O-3 und O-6 bezeichnet), die substituiert werden können. Zur Beschreibung des Ausmaßes der Substitution einer Probe wird der mittlere Substitutionsgrad (DS, englisch degree of substitution) verwendet, welcher die mittlere Anzahl der substituierten OH-Gruppen pro AGU beschreibt:

$$DS = \frac{\text{Anzahl derivatisierter OH - Gruppen}}{\text{Anzahl der AGUs}}$$

Gleichung 1

Nach der Definition kann DS Werte von null bis drei annehmen und beschreibt die durchschnittliche Häufigkeit der Substituenten im Polymer. Der DS-Wert übt einen bedeutenden Einfluss auf die Eigenschaften der NaCMC, wie z.B. Wasserlöslichkeit, Viskositätsverhalten in Lösung und Biostabilität, aus [10-13]. So sind z.B. die stärker hydrophoben niedrig substituierten NaCMCn thixotrop, während die höher substituierten NaCMCn pseudoplastisch (strukturviskos) sind [5, 14].

Bei partiell substituierten NaCMCn mit  $0 < DS < 3$  (kommerzielle NaCMCn besitzen DS zwischen 0.4 und 1.5) können die CM-Substituenten sich unterschiedlich innerhalb der Probe verteilen. Hier spricht man von chemischer Heterogenität. In NaCMCn lassen sich mindestens drei unterschiedliche Ebenen der molekularen chemischen Heterogenität unterscheiden.

Zum einen können sich die Substituenten unterschiedlich auf die drei Hydroxylgruppen O-2, O-3 und O-6 innerhalb einer AGU verteilen. Dies bezeichnet man als Substitutionsmuster der AGU. Weiterhin existieren bei einer einzigen Substituentenart acht unterschiedlich substituierte AGUs, die beispielhaft in Abb. 4 für NaCMC dargestellt sind. So lassen sich eine unsubstituierte AGU, drei isomere einfach, drei isomere zweifach und eine vollständig dreifach substituierte AGU unterscheiden. In beiden Fällen (beim Substitutionsmuster und bei den acht unterschiedlich substituierten AGUs) spricht man von der chemischen Heterogenität auf der Monomeren(AGU)ebene.

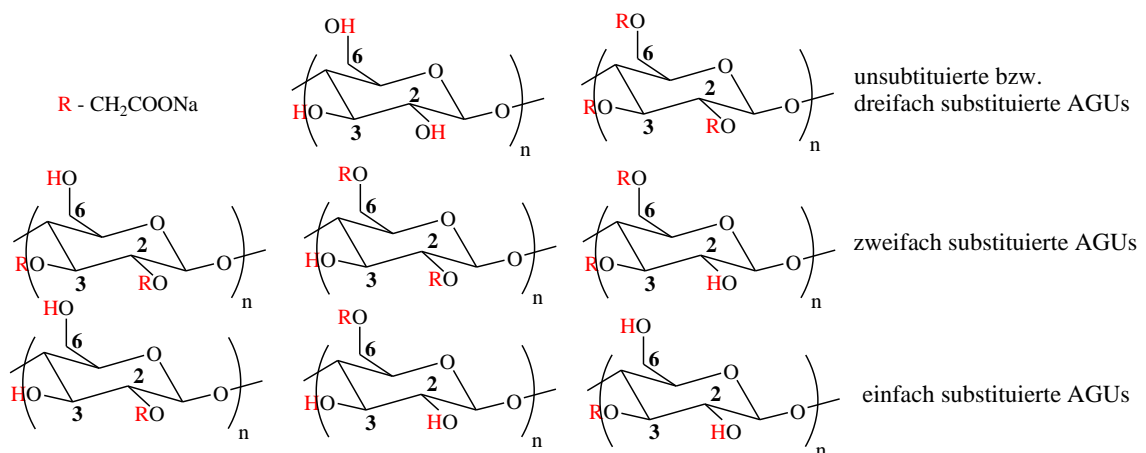


Abb. 4: Die acht unterschiedlich substituierten AGUs von NaCMC.

Außer der chemischen Heterogenität auf der AGU-Ebene können sich die Substituenten auch unterschiedlich über die unterschiedlichen Polymerketten verteilen, was folglich dazu führt, dass innerhalb einer NaCMC-Probe Ketten mit unterschiedlichen Substitutionsgraden vorliegen können. Dies wird als chemische Heterogenität 1. Ordnung bezeichnet. Auch wenn zwei Proben gleiche DS-Werte, gleiche Substitutionsmuster und gleiche Anteile unterschiedlich substituierter AGUs besitzen, können sie unterschiedliche chemische Heterogenitäten 1. Ordnung aufweisen. Dies ist anschaulich in Abb. 5 dargestellt. Der mittlere Substitutionsgrad DS der beiden NaCMC-Proben beläuft sich auf 1.5. Da im angenommenen Beispiel nur eine dreifache Substitution innerhalb der AGUs vorliegt, sind sowohl die Substitutionsmuster als auch die Anteile unterschiedlich substituierter AGUs für die beiden Proben gleich. Die  $DS_i$ -Werte der individuellen Ketten allerdings unterscheiden sich – für die Probe 1 erstrecken sie sich von 0 bis 3 und für die Probe 2 von 1.38 bis 1.62. Die beiden Proben unterscheiden sich somit bezüglich der chemischen Heterogenität 1. Ordnung.

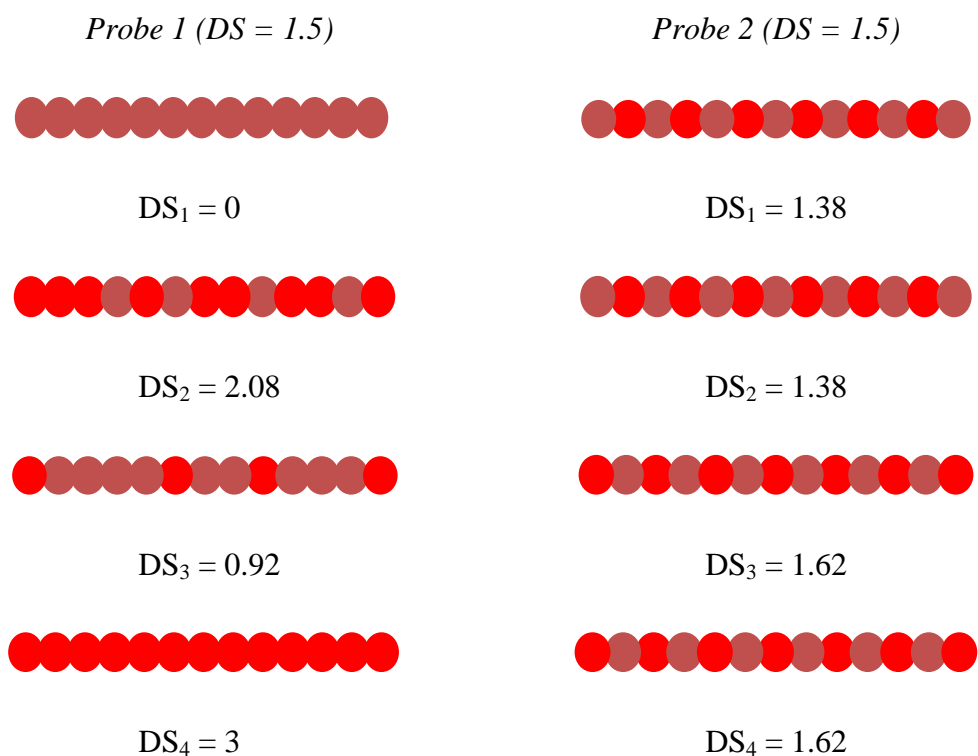


Abb. 5: Polymerketten zweier hypothetischer NaCMC-Proben, mit gleichem DS-Wert, Substitutionsmuster und den Anteilen unterschiedlich substituierter AGUs, die jedoch unterschiedliche chemische Heterogenitäten 1. Ordnung aufweisen. Rote und braune Kugeln repräsentieren jeweils AGUs, die dreifach bzw. unsubstituiert sind. Links – Probe 1, rechts – Probe 2.  $DS_i$  – mittlere Substitutionsgrade individueller Ketten.

Neben der Tatsache, dass sich die Substituenten unterschiedlich über die verschiedenen Ketten verteilen können, können sie sich auch unterschiedlich entlang der Ketten verteilen, so

dass blockartig oder statistisch aufgebaute Ketten entstehen können. Dies bezeichnet man auch als chemische Heterogenität 2. Ordnung. Anschaulich ist dies in Abb. 6 dargestellt. Die beiden dargestellten NaCMC-Proben besitzen den gleichen DS-Wert von 1.56 und gleiches Substitutionsmuster der AGUs (dreifach bzw. unsubstituiert). Außerdem besitzen die Proben eine identische Heterogenität 1. Ordnung (gleiche  $DS_i$ -Werte einzelner Ketten). Die beiden Proben unterscheiden sich jedoch in ihrem Kettenaufbau (Heterogenität 2. Ordnung) – links in der Probe 1 liegt ein mehr blockartiger und rechts in der Probe 2 ein mehr statistischer Aufbau vor.

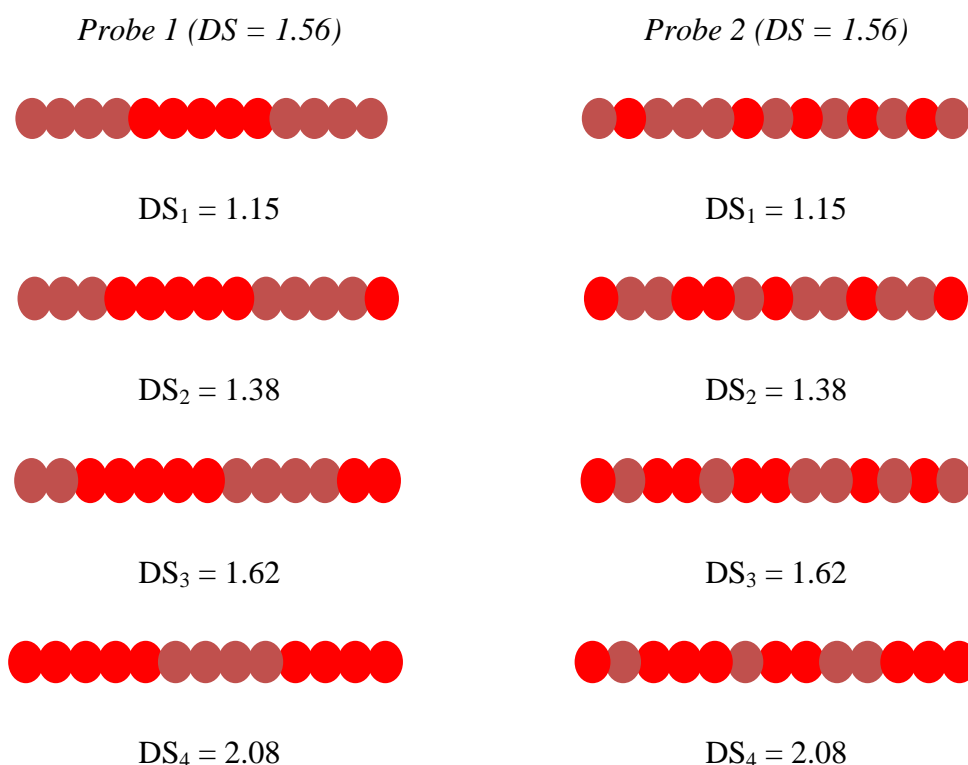


Abb. 6: Polymerketten zweier hypothetischer NaCMC-Proben, die den gleichen DS-Wert, Substitutionsmuster, Anteile unterschiedlich substituierter AGUs und Heterogenität 1. Ordnung besitzen, jedoch unterschiedlichen Kettenaufbau oder die Heterogenität 2. Ordnung aufweisen. Rote und braune Kugeln repräsentieren jeweils AGUs, die dreifach bzw. unsubstituiert sind. Links – Probe 1, rechts – Probe 2.  $DS_i$  – mittlere Substitutionsgrade individueller Ketten.

Neben der Substituentenverteilung besitzen alle NaCMCn natürlich auch eine Molekulargewichtsverteilung, was eine weitere Heterogenität darstellt.

Alle erwähnten Heterogenitäten können unabhängig voneinander oder miteinander korreliert auftreten. Z.B. können kurze Ketten eine niedrige Substitution und lange Ketten höhere Substitutionsgrade aufweisen. In diesem Fall sind der Substitutionsgrad und die

Molekulargewichte miteinander korreliert. Ein anderer Fall liegt vor, wenn z.B. ein blockartiger Aufbau nur auftritt, wenn dominierende Anteile dreifachsubstituierter AGUs vorhanden sind. In diesem Fall sind die Heterogenität 2. Ordnung und die Heterogenität auf der AGU-Ebene miteinander korreliert.

Auch wenn zwei NaCMC-Proben den gleichen DS-Wert aufweisen, können sie sich in ihrem Substitutionsmuster und den Anteilen unterschiedlich substituierter AGUs und dadurch in ihren Eigenschaften unterscheiden [6, 7, 15]. Dies kann am Beispiel der Wasserlöslichkeit von NaCMCn betrachtet werden. Bei Produkten, die mittels Slurry-Verfahren hergestellt wurden, gilt für die partielle Substitution der OH-Gruppen innerhalb der AGUs  $O-2 > O-6 \gg O-3$  [4]. Die unterschiedlich substituierten AGUs weisen dabei eine statistische Verteilung auf (gemeint ist die Spurlin-Statistik, siehe unten). Derartige NaCMCn sind ab einem DS von 0.4 wasserlöslich [7]. Wenn die Cellulose hingegen bei der Synthese zunächst in DMSO/TBAF gelöst, mit festem wasserfreien NaOH aktiviert und dann substituiert wird, entstehen Produkte mit nicht statistischen (Spurlin-Statistik) Anteilen der unterschiedlich substituierten AGUs, bei denen für die partiellen Substitutionsgrade innerhalb der AGUs  $O-6 > O-2 \geq O-3$  gilt [7]. Diese NaCMCn lösen sich erst ab einem DS von 0.85 im Wasser [4, 7]. Es soll erwähnt werden, dass bei den beiden Synthesen ein mehr oder weniger statistischer Kettenaufbau entsteht.

Die erwähnte Spurlin-Statistik, die im Jahr 1939 entwickelt wurde, ist ein kinetisches Modell, welches die Anteile der acht unterschiedlich substituierten AGUs in Cellulosederivaten für einen bestimmten mittleren DS-Wert vorhersagt [16], wenn die folgenden Voraussetzungen während der Synthese erfüllt sind:

- Alle OH-Gruppen der Cellulose sind gleich gut zugänglich
- Verhältnisse der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion an den drei unterschiedlichen Hydroxylgruppen in der AGU O-2, O-3 und O-6 (relativen Reaktivitäten drei OH-Gruppen in der AGU) bleiben im Laufe der Reaktion konstant und werden auch nicht durch die bereits erfolgte Substitution in der AGU oder an einer anderen Stelle im Polymermolekül beeinflusst (dabei können sich die absoluten Reaktivitäten drei OH-Gruppen jedoch voneinander unterscheiden und sich auch im Laufe der Reaktion ändern)

- die Substitutionsreaktion ist irreversibel
- die Kettenenden oder andere Störungen wie partiell oxidierte AGUs üben keinen Einfluss auf die Reaktion aus

Das Spurlinmodell ist sehr nützlich um Informationen über den Mechanismus der Derivatisierungsreaktion zu gewinnen. Dabei werden die experimentell bestimmten Anteile der unterschiedlich substituierten AGUs einer Probe mit den nach dem Modell berechneten Anteilen verglichen. Die Übereinstimmung bzw. Abweichung der experimentellen von den berechneten Werten spiegelt die Übereinstimmung bzw. Abweichung der Reaktionsführung vom Modell wieder. Im Falle einer weitgehenden Übereinstimmung wird angenommen, dass die Substitution statistisch nach Spurlin abläuft.

Auch die chemische Heterogenität 1. Ordnung kann die Eigenschaften von NaCMCn beeinflussen. Bis heute wurde jedoch der Einfluss der Heterogenität 1. Ordnung auf die Anwendungseigenschaften von NaCMCn kaum untersucht, da keine effizienten analytischen Methoden existieren, die Heterogenität 1. Ordnung möglichst unabhängig von den anderen Heterogenitätsarten zu bestimmen.

Was die Substituentenverteilung entlang der Ketten (die chemische Heterogenität 2. Ordnung) anbetrifft, gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass bei homogenen Carboxymethylierungsreaktionen durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel verschiedenartig aufgebaute NaCMC-Ketten entstehen können, was sich auch in den Produkteigenschaften widerspiegelt. So weisen z.B. NaCMC-Produkte, die durch eine homogene Reaktionsführung durch Lösen von Cellulose in DMSO/TBAF und Aktivierung mit festem NaOH hergestellt wurden, einen mehr oder weniger statistischen Kettenaufbau auf und sind ab einem DS von 0.85 wasserlöslich [4, 7]. In Gegensatz dazu sind NaCMCn, die mittels Derivatisierung in einer sogenannten „reaktiven Mikrostruktur“ (auch „induced phase separation“ genannt) synthetisiert werden, mehr blockartig entlang der Ketten aufgebaut. Dies führt dazu, dass derartige Produkte erst ab einem DS von 1.5 im Wasser gelöst werden können [4, 6, 7]. Die zuletzt erwähnte Synthese zeichnet sich dadurch aus, dass die Cellulose zuerst in DMAc/LiCl gelöst wird und dann mit festem wasserfreien NaOH aktiviert wird, wobei das Polymer unregelmäßig auf der NaOH-Oberfläche adsorbiert wird. Dabei bildet sich eine hochreaktive Grenzfläche zwischen dem NaOH und dem Polymer, die „reaktive Mikrostruktur“ genannt wird. Die Substitutionsreaktion der Cellulose findet bevorzugt in

dieser Mikrostruktur statt. Es soll erwähnt werden, dass bei den beiden oben miteinander verglichenen Synthesen das gleiche Substitutionsmuster ( $O-6 > O-2 \geq O-3$ ) sowie nicht-statistische Anteile der unterschiedlich substituierten AGUs gefunden werden. Auch die Art des verwendeten Alkohols beim Slurry-Verfahren beeinflusst die Produkteigenschaften. Unter Verwendung von Ethanol werden z.B. NaCMCn erhalten, die, wenn sie in Anwesenheit niedermolekularer Salze gelöst werden, kleinere Tendenzen zur Gelausbildung aufweisen, als solche, die mit Iso-propanol als Slurry-Medium resultieren [17]. Die Ursache dafür liegt im unterschiedlichen Kettenaufbau. Unter Verwendung von Isopropanol erhaltene Ketten sind mehr blockartig aufgebaut als die unter Verwendung von Ethanol.

Die Molekulargewichtsverteilung hat ebenfalls Einfluss auf die Eigenschaften der NaCMCn, z.B. auf die Viskosität in Lösung [4, 18]. Auch die Korrelationen unterschiedlicher Heterogenitätsarten können Eigenschaften von NaCMCn beeinflussen.

Um Struktur-Eigenschaftsbeziehungen für NaCMCn aufstellen und damit maßgeschneiderte Produkte herstellen zu können, sind die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung, der chemischen Heterogenitäten auf allen drei erwähnten Ebenen sowie eventuell bestehender Korrelationen unterschiedlicher Heterogenitätsarten unabdingbar. Im nächsten Kapitel werden die hierfür bereits bestehenden und etablierten analytischen Charakterisierungsmethoden beschrieben. Gleichzeitig wird gezeigt, wo noch Forschungsbedarf besteht, und woraus die Motivation für die vorliegende Arbeit entstand.

#### **1.4 Analytische Charakterisierung der molekularen Heterogenität von NaCMCn, Stand der Forschung**

Wie es im letzten Kapitel gezeigt wurde, sind NaCMCn heterogen. Die chemische Heterogenität und die Molekulargewichtsverteilung sowie deren Korrelationen beeinflussen die Anwendungseigenschaften der NaCMCn. Um Struktur-Eigenschaftsbeziehungen für NaCMCn zu erstellen ist daher die Charakterisierung der molekularen Struktur mithilfe geeigneter analytischer Methoden von primärer Bedeutung.

Da NaCMCn schon seit langem bekannt sind und ein sehr breites Anwendungsspektrum haben, wurden bereits viele Versuche unternommen um ihre molekulare Struktur zu charakterisieren.

Die Molekulargewichtsverteilungen werden z.B. überwiegend mittels SEC (size exclusion chromatography) unter Verwendung verschiedener Detektionsmethoden bestimmt, wobei geeignete stationäre und mobile Phasen in der Literatur beschrieben sind [18-22].

Für die Bestimmung des DS-Wertes sind zahlreiche Methoden beschrieben worden. Die ersten Bestimmungen des mittleren Substitutionsgrades von NaCMC basierten auf Titrationen. Über potentiometrische, konduktometrische sowie indikatorbasierte Titrationen berichtete Eyler [10]. Sakurada [23] beschrieb eine Methode der DS-Bestimmung, wobei NaCMC verascht wird und die verbliebene Asche quantitativ bezüglich ihres Na-Gehaltes analysiert wird. Francis [24] bestimmte den DS-Wert von NaCMCn gravimetrisch durch Fällung mit Uranylionen. Der DS-Wert kann auch durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in Lösungen intakter NaCMCn [25] oder mittels Festkörper- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ( $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-NMR) bestimmt werden [26]. Außerdem wurde berichtet, dass auch mittels Kapillarelektrophorese an intakten Ketten der DS-Wert von NaCMCn bestimmt werden kann [12].

DS und das Substitutionsmuster innerhalb der AGUs (oder partieller DS an den Kohlenstoffatomen O-2, O-3 und O-6 innerhalb AGUs) kann nach einer vollständigen säurekatalysierten Hydrolyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie [13] bestimmt werden. Baar et al. [27] und Käuper et al. [26] bestimmten DS und das Substitutionsmuster von NaCMCn durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie nach partiellem Ultraschallabbau.

DS und die Anteile der mono-, di-, tri- und unsubstituierten AGUs (ohne Informationen über die Verteilung der Substituenten auf die drei AGU-Kohlenstoffatome) können nach vollständigem säurekatalytischen Kettenabbau entweder mittels Ionenausschlusschromatographie [28] oder mittels GC-MS [29] bestimmt werden. Im zweiten Fall müssen die Hydrolysate vor der GC-Messung silyliert werden.

DS und die Anteile aller acht unterschiedlich substituierter AGUs können nach vollständigem säurekatalysierten Kettenabbau sowohl mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie [30] als auch mittels Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion [31, 32] bestimmt werden. Zeller et al. [33] entwickelte zur Bestimmung der Anteile der acht unterschiedlich substituierten AGUs eine Methode der reduktiven Spaltung, wobei NaCMCn zuerst permethyliert und reduktiv gespalten werden, was die Anomerenbildung unterdrückt. Anschließend werden die gebildeten acht Glucosederivate, die aus den acht unterschiedlich



substituierten AGUs entstehen, mittels Gas-Flüssigkeitschromatographie quantitativ getrennt. Für Carboxymethylstärken konnten die Anteile der acht substituierten AGUs auch mittels Kapillarelektrophorese nach vollständigem säurekatalytischen Kettenabbau erhalten werden [34, 35], was mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für NaCMCn anwendbar ist.

Von den oben beschriebenen analytischen Methoden konnten nur mittels Kapillarelektrophorese an nicht abgebauten [12] und an partiell enzymatisch abgebauten Polymerketten [34] Informationen über die chemische Heterogenität von NaCMCn auf der Polymerebene gewonnen werden. Outhoff et al. [12] gelang es intakte NaCMC-Ketten mittels Kapillarelektrophorese nach ihren DS-Werten zu trennen und so die „DS-Dispersitäten“ (DS-Verteilungen) der Proben zu bestimmen. Diese DS-Verteilungen sollten die chemische Heterogenität 1. Ordnung beschreiben, wenn angenommen werden kann, dass der Einfluss anderer Heterogenitäten auf die kapillarelektrophoretische Trennung vernachlässigbar ist. Allerdings ist die Detektion von NaCMCn bei der verwendeten Methode sowie die Kopplung mit spektroskopischen und spektrometrischen Methoden, die geeignet sind, um zusätzliche Informationen zu den eluierenden Fraktionen zu erhalten, aufgrund der geringen Substanzmengen schwierig, was ihre weitere Entwicklung einschränkt. Die anderen oben beschriebenen analytischen Charakterisierungsmethoden können zur Bestimmung der chemischen Heterogenität auf der Polymerebene nicht eingesetzt werden, da sie entweder auf einem vollständigen Abbau basieren, wobei die Informationen über die Heterogenität auf der Polymerebene vollständig verloren gehen, oder wie bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie oder Titrationen nicht unterscheiden können, von welchen Ketten die Informationen stammen.

Um die Substituentenverteilung auf der Polymerebene bestimmen zu können wurde bislang für NaCMCn eine Strategie verfolgt, die auf einem selektiven enzymatischen Abbau der Polymerketten beruht. Dabei wird die sterische Behinderung durch die Substituenten beim enzymatischen Abbau genutzt. Da Enzyme wie Cellulasen und Endoglucanasen nur in Bereichen mit geringer Substitution eine Spaltung bewirken können, sollten die aus einem enzymatischen Abbau gewonnenen Oligomerfragmente Informationen über die Substituentenverteilung entlang der Kette (Heterogenität 2. Ordnung) enthalten. Verschiedene hierauf basierende analytische Ansätze wurden verfolgt. Alle basieren, wie schon erwähnt, auf der partiellen enzymatischen Spaltung der Polymerketten und der anschließenden Charakterisierung gebildeter Oligomere. Gelman [11] verfolgte den Abbau von NaCMCn als Funktion der Zeit mittels Viskositäts- und Messungen reduzierender Endgruppen. Mit

fortschreitendem Abbau (Senkung der Viskosität bzw. Molmasse) konnte er Veränderung in der Anzahl der Kettenenden und der Menge freier Glucosen (Zucker) verfolgen, woraus er die Anzahl und Länge der aus unsubstituierten AGUs bestehenden Blöcke bestimmen konnte. Hierbei lag die Annahme zugrunde, dass das Enzym nur zwischen zwei benachbarten unsubstituierten AGUs eine Spaltung bewirken kann. In anderen Arbeiten [6, 36, 37] wurden die bei der enzymatischen Spaltung gebildete Oligomere zuerst mittels SEC nach ihrer Größe (bzw. Molmasse) getrennt. Anschließend wurden die bezüglich Molmasse engverteilten Oligomerfraktionen säurekatalytisch zu den Monomeren abgebaut und mittels Anionenaustauschchromatographie mit pulsamperometrischer Detektion bezüglich der Zusammensetzung der AGUs analysiert. Die Molmassenverteilung der Oligomeren sowie ihre chemische Zusammensetzung liefern dann Informationen über den Aufbau der ursprünglichen NaCMC-Ketten. Enebro et al. [38, 39] untersuchten die mittels enzymatischer Spaltung gebildeten Oligomere bezüglich ihrer chemischen Modifizierung mittels MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), ESI-MS/MS (electrospray ionization tandem mass spectrometry) und mittels LC-MS bzw. LC-MS/MS (Flüssigchromatographie auf einer Umkehrphase mit einer massen- bzw. tandemmassenspektrometrischen Detektion). LC-MS wurde auch von Cohen et al. [40] verwendet um die durch enzymatischen Abbau gewonnenen Oligomere zu charakterisieren. Mit diesen Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die Enzyme doch nicht nur zwischen zwei benachbarten unsubstituierten AGUs eine Spaltung bewirken, sondern auch dann, wenn eine oder beide der benachbarten AGUs einfach substituiert sind. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei der Spaltung das Substitutionsmuster eine Rolle spielt und dass unterschiedliche Enzyme unterschiedliche Selektivitäten bezüglich des Substitutionsmusters der verbundenen AGUs aufweisen.

Generell lassen sich jedoch hoch substituierte Cellulosederivate mit steigendem DS zunehmend schlechter enzymatisch fragmentieren. Eine enzymunterstützte Analytik ist daher nur für Cellulosederivate im unteren bis mittleren DS-Bereich anwendbar. Für Derivate mit sehr hohen DS-Werten sind hingegen die Möglichkeiten dieser Methode beschränkt oder sie ist gänzlich ungeeignet. Andererseits sollten bei hohen DS-Werten auch die Inhomogenitäten innerhalb der Proben von immer geringerer Bedeutung werden, so dass weniger Bedarf zur Untersuchung der Substituentenverteilung entlang der Kette besteht [41].

Für Methylcellulosen (MCs) wurde zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität auf der Polymerebene noch eine weitere Strategie verfolgt [41, 42], die auf einer statistischen partiellen Säurespaltung basiert. Die entstandenen Oligomere werden nach ihrer Kettenlänge mittels GC (Gaschromatographie) getrennt und mittels FAB-MS (fast atom bombardment mass spectrometry) hinsichtlich ihres Substitutionsmusters analysiert. Für einen bestimmten Polymerisationsgrad wird dann die prozentuale Häufigkeit verschiedener Substitutionsgrade als Verteilungskurve dargestellt und mit den Modellrechnungen basierend auf einem statistischen Abbau verglichen. Die Abweichungen vom statistischen Modell lassen Rückschlüsse auf die Heterogenität bzw. Homogenität der Verteilung der AGUs entlang der Ketten von Methylcellulosen zu. Für drei MCs, die in einer heterogenen Synthese hergestellt wurden, wurde festgestellt, dass Bereiche niedriger und hoher Substitution, also eine gewisse chemische Heterogenität, entlang der Ketten existieren. Es wurde festgestellt, dass in der untersuchten Probenreihe die Probe, die die höchste Heterogenität auf der Oligomerebene zeigt, auch die höchste Heterogenität auf der Monomerebene besitzt und umgekehrt. Für NaCMCn wurde diese Strategie allerdings nach meinem besten Wissen nicht verwendet.

Die zwei beschriebenen Strategien liefern wichtige Informationen zur chemischen Heterogenität auf der Polymerebene von Cellulosederivaten. Da sie allerdings auf dem partiellen Abbau ursprünglich vorhandener Polymerketten basieren, kann nicht festgestellt werden, ob die erzeugten unterschiedlich aufgebauten Oligomere von ein und derselben Kette oder von unterschiedlichen Ketten stammen. Somit kann mit diesen Methoden nicht zwischen chemischer Heterogenität 1. und 2. Ordnung unterschieden werden.

Neben der Trennung intakter NaCMC-Ketten durch Kapillarelektrophorese [12] fraktionierte Saake et al. [6] intakte NaCMC-Ketten, die durch Derivatisierung in der oben erwähnten „reaktiven Mikrostruktur“ (auch „induced phase separation“ genannt) hergestellt wurden, nach ihrer Löslichkeit in Wasser durch Fällungsexperimente. Dabei fällte er stufenweise die im Wasser gelösten NaCMC mit Ethanol in vier Fraktionen. Anschließend charakterisierte er die erhaltenen Fraktionen bezüglich des DS und des Substitutionsmusters. Die Fraktionen besaßen unterschiedliche DS-Werte, was auf eine chemische Heterogenität 1. Ordnung hindeutete. Allerdings konnte keine eindeutige Korrelation zwischen DS und Löslichkeit festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass außer DS auch andere Parameter wie z.B. die Kettenlänge oder die chemische Heterogenität 2. Ordnung die Löslichkeit beeinflussen. Hierdurch wird die Selektivität der Methode erheblich verringert, wodurch keine reine

chemische Heterogenität 1. Ordnung bestimmt werden kann. Ein ähnliches Vorgehen wurde auch für Methylcellulosen beschrieben [43, 44]. Durch Extraktion mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln konnten Methylcellulosen in fünf Fraktionen sinkender DS-Werte getrennt werden. Hierbei konnte ein deutlicher DS-Gradient innerhalb der Proben nachgewiesen werden. Dies belegt eine chemische Heterogenität 1. Ordnung in den verwendeten MCn. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Polarität (bzw. Löslichkeit) von Methylcellulosen eindeutiger und ausgeprägter mit DS korreliert, als das für NaCMCn der Fall ist. Zusätzlich wurden in den genannten Arbeiten über MCn Korrelationen zwischen der chemischen Heterogenität 1. und 2. Ordnung sowie zwischen der Heterogenität 1. Ordnung und dem Substitutionsmuster innerhalb der AGUs untersucht und sehr interessante Ergebnisse erzielt. Allerdings sollte erwähnt werden, dass die verwendete Fraktionierungsmethode einen großen Zeitaufwand, erhebliche Proben- und Lösungsmittelmengen benötigt und zudem schwer automatisierbar ist.

Fischer et al. [45] untersuchte NaCMCn durch SEC mit verschiedenen Detektoren. Zum einen wurde ein MALLS-Detektor zur Bestimmung absoluter Molmassen der SEC-Fractionen, zum anderen ein UV-Detektor zur Bestimmung ihrer chemischen Zusammensetzung (DS) eingesetzt. Hierzu mussten jedoch die Carboxymethylsubstituenten vorher zu UV-aktiven Amidocarboxymethylsubstituenten umgesetzt werden. Auf diese Weise konnte zu jeder bezüglich Molmasse engverteilten SEC-Fraktion die chemische Zusammensetzung (DS) bestimmt werden. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass sich bei niedrigviskosen NaCMCn die Amidocarboxymethylsubstituenten nahezu gleichmäßig auf alle Molmassen verteilen, während bei hochviskosen NaCMCn eine höhere Substitution kleinerer Molmassen vorliegt. In einer weiteren Arbeit [46] wurde Methylcellulose durch off-line SEC-<sup>1</sup>H-NMR-Kopplung untersucht, was für NaCMC zwar noch nicht durchgeführt wurde, allerdings theoretisch möglich ist. Es wurde gezeigt, dass für Methylcellulosen die Abhängigkeit des Molekulargewichtes vom DS durch ein Maximum durchläuft. Generell eignen sich auf SEC basierende Methoden jedoch nur zur Untersuchung der Korrelation zwischen dem Molekulargewicht und DS. Die Abschätzung der Heterogenität 1. Ordnung kann auf diese Weise nur für solche Proben erfolgen, die eine starke Abhängigkeit des Substitutionsgrades von der Molmasse zeigen.

Kawai et al. [47] berichteten über Trennungen intakter Celluloseacetatketten nach DS mittels Flüssigadsorptionschromatographie bei Verwendung einer Umkehrphase. Auch Ghareeb et al.

[48] trennten Celluloseacetate im DS-Bereich 1.5 – 2.9 nach ihrer chemischen Zusammensetzung (DS) mittels Gradientenchromatographie und bestimmten so die DS-Verteilungen individueller Proben. Für NaCMCn wurden nach meinem besten Wissen keine ähnlichen Berichte publiziert.

Mann et al. [49] verwendeten  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität intakter NaCMCn auf der Polymerebene. Er berichtete, dass die Kohlenstoffatome C-4 und C-6 der AGUs unterschiedliche chemische Verschiebungen in Feststoff-NMR-Spektren aufweisen, wenn sie in kristallinen bzw. amorphen Bereichen der Probe eingeschlossen sind. Da die kristallinen Bereiche die Anwesenheit von unsubstituierten Sequenzen (Blöcken) innerhalb der Proben erfordern, zwischen denen intra- und intermolekulare Wechselwirkungen vorhanden sind, kann anhand genannter NMR-Spektren geschlossen werden, ob ein mehr blockartiger oder ein mehr statistischer Kettenaufbau vorliegt. Allerdings kann auch hier nicht zwischen der Heterogenität 1. und 2. Ordnung unterschieden werden.

## **2 MOTIVATION DER ARBEIT UND ZIELSETZUNG**

Wie in den vorherigen Kapiteln ausführlich erläutert wurde, beeinflussen alle Arten der molekularen Heterogenität sowie ihre Korrelationen untereinander die Anwendungseigenschaften von NaCMC<sub>n</sub>. Um gezielt Produkte mit speziellen Eigenschaften herstellen zu können bzw. diese Eigenschaften vorhersagen zu können, ist eine umfassende Charakterisierung von NaCMC<sub>n</sub> notwendig, die die Bestimmung aller erwähnten Heterogenitätsarten unabhängig voneinander beinhaltet. Dafür werden schnelle, effiziente und aussagekräftige analytische Methoden benötigt.

Bisher wurde über die Charakterisierung der chemischen Heterogenität 1. Ordnung (Substituentenverteilung über verschiedene Polymerketten) und des Einflusses auf die Produkteigenschaften nur wenig berichtet. Mehr Informationen sind zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität 2. Ordnung (entlang der Ketten) verfügbar. Jedoch sind in vielen Fällen die erhaltenen Ergebnisse nicht unabhängig von einer potentiell vorhandenen chemischen Heterogenität 1. Ordnung, da viele der etablierten analytischen Methoden entweder auf einem partiellen oder auf einem vollständigen Kettenaufbau beruhen. Durch die Kettenspaltung können jedoch Ketten mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und Aufbau nicht mehr voneinander unterschieden werden. Somit besteht ein Interesse daran, Methoden zu entwickeln, die eine Trennung intakter Polymerketten nach dem Substitutionsgrad erlauben. Die bisher verfolgten Ansätze, z.B. unter Verwendung der Kapillarelektrophorese, der Fällungsfractionierung oder der SEC gekoppelt mit chemisch sensitiven Detektoren konnten diese Aufgabe bisher noch nicht zufriedenstellend lösen.

Chromatographischen Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen Polymerketten und einer stationären Phase beruhen, wurde bislang nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Dabei ist es bekannt, dass sie zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität synthetischer Polymere [50, 51] gut geeignet sind. Diese Methoden besitzen gegenüber den bisher verwendeten Methoden einen wichtigen Vorteil, da damit intakte Polymerketten untersucht werden. Dieser eröffnet die Möglichkeit, die beiden erwähnten chemischen Heterogenitätsarten auf der Polymerebene voneinander zu unterscheiden. Außerdem benötigen sie nur geringe Substanzmengen. Weiterhin können sie relativ problemlos mit anderen Untersuchungsmethoden, seien es spektroskopische, spektrometrische oder andere chromatographische Methoden, gekoppelt werden um zusätzliche Informationen zu erhalten.

So könnten sich z.B. durch Kopplung mit der SEC Korrelationen zwischen dem Substitutionsgrad und dem Molekulargewicht aufzeigen lassen. Eine umfassendere Charakterisierung von NaCMCn wäre damit gewährleistet.

Daher war das Ziel für die vorliegende Arbeit die Entwicklung einer auf der Wechselwirkungschromatographie basierenden Trennmethode, die intakte NaCMC-Ketten nach ihrem DS-Wert trennt, woraus dann Informationen über die chemische Heterogenität 1. Ordnung erhalten werden können. Außerdem sollte durch Kopplung der entwickelten Methode mit der SEC im Sinn einer 2D-flüssigchromatographischen Trennung untersucht werden, ob Korrelationen zwischen dem Substitutionsgrad und dem Molekulargewicht bestehen.

### 3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

#### 3.1 Grundlagen der Flüssigchromatographie von Polymeren

Die Flüssigkeitschromatographie wird heutzutage oft zur Analyse von Polymeren eingesetzt. Je nach dem chromatographischen Modus resultiert eine Auftrennung der Probenkomponenten z.B. nach dem Molekulargewicht, nach der Art und/oder Anzahl von funktionellen Endgruppen oder nach der Art und Anzahl der verschiedenartigen Monomeren im Polymermolekül. Die chromatographische Trennung basiert dabei auf der unterschiedlichen Verteilung der Probenkomponenten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase.

Das Verteilungsgleichgewicht der Komponenten zwischen den Phasen lässt sich thermodynamisch beschreiben als:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_D$$

Gleichung 2

wobei  $K_D$  der Verteilungskoeffizient des Analyten ist, welcher das Konzentrationsverhältnis gelöster Analytmoleküle zwischen der stationären und mobilen Phase beschreibt:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Gleichung 3

Hierbei sind  $c_s$  die Konzentration des Analyten in der stationären und  $c_m$  in der mobilen Phase.

Der Verteilungskoeffizient  $K_D$  wird nach Gleichung 2 durch die freie Gibbs-Energie  $\Delta G$  bestimmt, welche sich aus einem enthalpischen ( $\Delta H$ ) und einem entropischen ( $T\Delta S$ ) Term zusammensetzt. Anhand der relativen Größen des enthalpischen und entropischen Anteils können drei verschiedene chromatographische Modi unterschieden werden: [52]

Größenausschlusschromatographie (SEC): Entropiegesteuerter chromatographischer Trennmodus, der auf den Unterschieden der hydrodynamischen Radien der Moleküle in verdünnter Lösung beruht.



Adsorptionschromatographie (LAC): Enthalpiedominierter chromatographischer Trennmodus, der durch Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den Polymermolekülen gesteuert wird.

Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC): Chromatographischer Modus, bei dem sich die entropischen und enthalpischen Effekte exakt kompensieren, d.h. bei welchem  $\Delta G = 0$  ist.

Auf die einzelnen chromatographischen Modi wird im Folgenden näher eingegangen.

### *Größenausschlusschromatographie*

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) wird standardmäßig dazu eingesetzt, mittlere Molmassen sowie Molekulargewichtsverteilungen von Polymeren zu bestimmen.

Die verwendeten Trennsäulen in der SEC sind mit kleinen Partikeln eines porösen hochvernetzten Materials (Gels) gefüllt. Die Poren des Gels besitzen dabei eine bestimmte Porengrößenverteilung. Der Trennmechanismus beruht darauf, dass Moleküle unterschiedlicher hydrodynamischer Radien unterschiedlich gut in die Poren der stationären Phase eindringen. Moleküle mit einem großen hydrodynamischen Radius können weniger in die Poren eindringen, während Moleküle mit einem kleineren hydrodynamischen Radius besser eindringen und dadurch länger in den Poren der stationären Phase verweilen können.

Da die Polymermoleküle in den Poren der stationären Phase nicht mehr alle möglichen Konformationen einnehmen können, findet dieser Prozess unter der Entropieabnahme statt. Allerdings ergibt sich auch für starre Moleküle beim Eindringen in die Poren ein Entropieverlust. Dieser ist dadurch bedingt, dass Molekülbewegungen innerhalb der Pore durch die undurchdringliche Porenwand eingeschränkt sind. Bei der idealen SEC werden stationäre und mobile Phase so gewählt, dass die Polymermoleküle keine enthalpischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen ( $\Delta H = 0$ ). Die Gleichung 2 vereinfacht sich dann wie folgt:

$$K_D = K_{SEC} = \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right)$$

Gleichung 4

Da während des Prozesses  $\Delta S \leq 0$  gilt, kann  $K_{\text{SEC}}$  nur die Werte  $\leq 1$  annehmen.

Die chromatographische grundlegende Gleichung 5 bringt  $K_{\text{SEC}}$  in Verbindung mit dem Elutionsvolumen  $V_R$ , bei dem die Analytmoleküle die stationäre Phase verlassen:

$$V_R = V_A + K_{\text{SEC}} V_p$$

Gleichung 5

Hierbei ist  $V_A$  das Ausschlussvolumen der Säule. Es beschreibt das Volumen der mobilen Phase, das zur Elution von Polymermolekülen benötigt wird, die wegen ihrer Größe nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können. Es stellt gleichzeitig das Zwischenkornvolumen dar.  $V_p$  ist das Porenvolumen der stationären Phase. Die Porengrößenverteilung bestimmt der Trennbereich in der SEC (definiert als der Bereich der hydrodynamischen Volumina, innerhalb derer eine effektive Trennung möglich ist).

Wie schon oben erwähnt wurde, gilt  $K_{\text{SEC}} \leq 1$ . Bei  $K_{\text{SEC}} = 1$  gilt  $V_R = V_A + V_p$ . Dieser Grenzfall wird als eine totale Permeation bezeichnet. Dies bedeutet, dass Moleküle unterhalb einer bestimmten Größe nicht mehr effektiv getrennt werden können, da sie nahezu ungehindert in die Poren der stationären Phase eindringen können und somit unabhängig von ihrer Molekülgröße für identische Zeiten in den Poren verweilen. Der zweite Grenzfall liegt bei  $K_{\text{SEC}} = 0$  vor, woraus  $V_R = V_A$  folgt. Ab einer bestimmten Größe können Polymermoleküle nicht mehr in die Poren der stationären Phase eindringen und eluieren folglich alle bei identischen Zeiten am Ausschlussvolumen [52].

Da die SEC nicht direkt nach der Molmasse sondern nach dem hydrodynamischen Volumen trennt, wird zur Bestimmung von Molekulargewichtsverteilungen eine Kalibrierkurve benötigt, die das Elutionsvolumen ins Verhältnis zur Molmasse setzt. Konventionell wird die Kalibrierung wie folgt durchgeführt. Kalibrationsstandards mit bekannten Molekulargewichten und engen Molekulargewichtsverteilungen werden auf die Säule injiziert, und die zugehörigen Elutionsvolumen ermittelt. Die Molekulargewichte der Kalibrationsstandards werden gegen die entsprechenden Elutionsvolumen aufgetragen. Diese Kalibrierkurve erlaubt es, das Molekulargewicht einer unbekannten Probe ausgehend vom gemessenen Elutionsvolumen zu bestimmen. Da die Trennung in der SEC, wie erwähnt, nach

dem hydrodynamischen Volumen und nicht nach dem Molekulargewicht erfolgt, müssen die Kalibrationsstandards die gleiche chemische Natur und Topologie wie die Probe aufweisen.

Wenn Kalibrationsstandards mit gleicher chemischen Struktur wie die zu analysierende Probe nicht zur Verfügung stehen, kann das von Benoit et al. [53] entwickelte Verfahren der universellen Kalibration angewandt werden. Dies ist aber nur unter der Voraussetzung möglich, dass die Trennung streng durch Entropieeffekte und ohne jegliche enthalpischen Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen und der stationären Phase erfolgt. Mit Hilfe der universellen Kalibrierung lassen sich die Kalibrationskurven chemisch unterschiedlicher Polymere ineinander umrechnen. Die Vorgehensweise wird im Folgenden beschrieben.

Das hydrodynamische Volumen  $V_h$ , welches die eigentliche Trenngröße in der SEC darstellt, ist proportional zum Produkt aus der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  und dem Molekulargewicht  $M$ :  $V_h \propto [\eta] \cdot M$ . Da in der SEC nach dem hydrodynamischen Volumen getrennt wird, gilt die Aussage: „Moleküle mit dem gleichen hydrodynamischen Volumen besitzen das gleiche Elutionsvolumen“. Daher gilt bei einem bestimmten Elutionsvolumen  $V_R$  für zwei unterschiedliche Polymere (Probe und ein Standard):

$$V_{h, \text{Standard}} = V_{h, \text{Probe}} \quad \text{für ein bestimmtes } V_R$$

Gleichung 6

$$\text{oder } [\eta]_{\text{Standard}} \cdot M_{\text{Standard}} = [\eta]_{\text{Probe}} \cdot M_{\text{Probe}}$$

Gleichung 7

Wenn  $[\eta]_{\text{Standard}} \cdot M_{\text{Standard}}$  für einen Standard und  $[\eta]_{\text{Probe}}$  für die Probe bekannt sind (z.B. mittels eines Viskositätsdetektors bestimmt), kann das Molekulargewicht  $M_{\text{Probe}}$  der bei gleichem Volumen eluierenden Probe bestimmt werden [54].

Wenn ein Viskositätsdetektor nicht zur Verfügung steht, kann die Mark-Houwink-Beziehung verwendet werden:

$$[\eta] = K \cdot [M]^a$$

Gleichung 8

Hierbei sind  $K$  und  $a$  die polymerspezifischen Mark-Houwink-Koeffizienten, die in der Literatur für viele Systeme angegeben sind.

Durch das Einsetzen von Gleichung 8 in Gleichung 7 und Auflösen nach  $M_{\text{Probe}}$  erhält man:

$$M_{\text{Probe}} = \left( \frac{K_{\text{Standard}} M_{\text{Standard}}^{a_{\text{Standard}}+1}}{K_{\text{Probe}}} \right)^{\frac{1}{a_{\text{Probe}}+1}}$$

Gleichung 9

Mit Hilfe dieser Gleichung ist man in der Lage das Molekulargewicht der Probe ( $M_{\text{Probe}}$ ) zu bestimmen, wenn das Molekulargewicht des Standards ( $M_{\text{Standard}}$ ) und die Mark-Houwink-Koeffizienten der beiden Polymeren unter den experimentellen Bedingungen (Lösungsmittel, Temperatur) bekannt sind.

Wenn die Mark-Houwink-Koeffizienten der entsprechenden Polymere im entsprechenden Lösungsmittel nicht bekannt sind, kann eine alternative Kalibrationsmethode, die auf breitverteilten Standards gleicher chemischen Natur wie die Probe basiert, angewandt werden. Mit dieser Methode können Korrekturfaktoren bestimmt werden, mit deren Hilfe eine konventionelle Kalibrierkurve (auch Grund- oder Basiskalibration genannt), die mit Standards beliebiger chemischen Struktur erstellt wurde, in eine für die jeweilige Probe geeignete Kalibrierkurve umgerechnet werden kann [55-57]. Neben der Basiskalibration benötigt man noch, wie erwähnt, eine oder mehr breitverteilten Proben mit einem oder zwei exakt bestimmten mittleren Molekulargewichten und die dazugehörigen SEC-Chromatogramme, wobei diese Probe(n) identische chemische Struktur wie die zu analysierende Probe aufweisen müssen.

Da die Methode ebenfalls auf der Gültigkeit der universellen Kalibration beruht, muss auch hier die Voraussetzung erfüllt sein, dass keine enthalpischen Wechselwirkungen der Standards und der Probe mit der stationären Phase auftreten.

Die Gleichung der Grundkalibration kann wie folgt ausgedrückt werden:

$$\log M_{\text{Standard}} = f(V_R) \Leftrightarrow M_{\text{Standard}} = 10^{f(V_R)}$$

Gleichung 10

wobei  $f(V_R)$  die Funktion der Kalibrierkurve ist [58].

Nach dem Kombinieren der Gleichung 9 und Gleichung 10 kann die Molmasse der eluierenden Probe beim gleichen Volumen wie der Standard wie folgt berechnet werden:

$$M_{\text{Probe}} = \left( \frac{K_{\text{Standard}} \times 10^{(a_{\text{Standard}}+1)f(V_R)}}{K_{\text{Probe}}} \right)^{\frac{1}{a_{\text{Probe}}+1}} = A \times 10^{Bf(V_R)}$$

Gleichung 11

$$\text{wobei } A = \left( \frac{K_{\text{Standard}}}{K_{\text{Probe}}} \right)^{\frac{1}{a_{\text{Probe}}+1}} \text{ und } B = \frac{a_{\text{Standard}} + 1}{a_{\text{Probe}} + 1}$$

Gleichung 12

die oben erwähnten Korrekturfaktoren sind.

Wenn die Korrekturfaktoren bekannt sind, kann die Grundkalibrierkurve in die zur Auswertung der unbekannten Probe geeignete Kalibrierkurve umgerechnet werden [58].

Um die Korrekturfaktoren zu bestimmen werden ein oder mehr breitverteilten Proben der gleichen chemischen Struktur wie die zu untersuchende Probe benötigt. Von diesen breitverteilten Proben werden mindestens zwei mittleren Molmassen und die zugehörigen SEC-Chromatogramme benötigt. Die gewichtsmittlere Molmasse der breitverteilten Probe,  $M_{w,\text{Probe}}$  lässt sich basierend auf dem jeweiligen SEC-Chromatogramm  $S(V_R)$  wie folgt berechnen [58]:

$$M_{w,\text{Probe}} = \frac{\int S(V_R) \times A \times 10^{Bf(V_R)} dV_R}{\int S dV_R}$$

Gleichung 13

wobei  $S(V_R)$  das RI-Signal im SEC-Chromatogramm der breitverteilten Probe bei einem bestimmten Elutionsvolumen  $V_R$  ist. Es sollte hier angemerkt werden, dass  $S(V_R)$  proportional zur Massenkonzentration der Wiederholeinheiten, die den Detektor passieren, angenommen wird. Die Korrekturfaktoren A und B können basierend auf dem SEC-Chromatogramm erhalten werden, in dem diese Faktoren so lange variiert werden, bis die beste Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten mittleren Molmassen für die breitverteilten Proben erhalten wird. Die so erhaltenen A- und B-Werte können dann zur Umrechnung der Basiskalibration in die Probenkalibration verwendet werden (via Gleichung 11). Mit dieser Kalibration können anschließend die absoluten Molmassen der unbekannten Proben bestimmt werden.

Wenn weder engverteilte noch breitverteilte Kalibrierstandards noch die Mark-Houwink-Koeffizienten für die zu untersuchende Probe zur Verfügung stehen, können Molmassen und Molekulargewichtsverteilungen durch die Kopplung der SEC mit molmassensensitiven Detektoren bestimmt werden. Als molmassensensitive Detektoren werden i.A. Viskositäts- oder Lichtstreuendetektoren verwendet. Auf die Kopplung der SEC mit der Lichtstreuung wird im Folgenden näher eingegangen.

SEC-MALLS (size exclusion chromatography - multi angle laser light scattering) kann nicht nur die mittleren Molmassen und die Molekulargewichtsverteilung, sondern auch der Trägheitsradius (Gyrationsradius) als Funktion des Molekulargewichtes bestimmen. Hieraus lassen sich Rückschlüsse über das Lösungsverhalten der Probe gewinnen. Schließlich können verzweigte Strukturen detektiert und quantifiziert werden.

Die theoretische Basis für die Auswertung von Lichtstreuexperimenten ist die folgende Gleichung:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)r^2}{I_0} = KcMP(\theta)(1 - A_2cM + \dots)$$

Gleichung 14

wobei  $R(\theta)$  das Rayleigh-Verhältnis, im Späteren nur Streuintensität genannt, der Polymerprobe mit Konzentration  $c$  und Molmasse  $M$  bei einem Streuwinkel  $\theta$  ist.  $I_0$  ist die Intensität des Primärstrahls,  $I(\theta)$  ist die Intensität des gestreuten Lichtes beim Streuwinkel (Beobachtungswinkel)  $\theta$ .  $r$  ist der Abstand zwischen dem streuenden Zentrum und dem

Detektor.  $A_2$  ist der zweite Virialkoeffizient, der die Wechselwirkungen des Polymeren mit dem Lösungsmittel beschreibt. Die Terme höherer Potenzen der Konzentration (mit „+ ...“ gekennzeichnet) können bei hinreichend kleinen Konzentrationen vernachlässigt werden.  $K$  ist eine optische Konstante, die nach Gleichung 15 definiert ist [58]:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2$$

Gleichung 15

Hierin ist  $n_0$  der Brechungsindex des Lösungsmittels bei der Wellenlänge des einfallenden Lichtes im Vakuum ( $\lambda_0$ ).  $N_A$  ist die Avogadrokonstante und  $dn/dc$  das spezifische Brechungsindexinkrement des Polymeren, welches die Änderung des Brechungsindex der Polymerlösung mit der Polymerkonzentration beschreibt.  $P(\theta)$  ist der Partikelformfaktor, welcher die Änderung der Streuintensität mit dem Streuwinkel beschreibt. Die Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität resultiert daraus, dass innerhalb von Molekülen, deren Dimensionen etwa der Wellenlänge des einfallenden Lichtes entsprechen, destruktive Interferenzen des an unterschiedlichen Molekülsegmenten gestreuten Lichtes auftreten. Bei  $\theta = 0$  werden keine destruktive Interferenzen beobachtet, woraus folgt  $P(\theta = 0) = 1$ . Unabhängig von der Form des streuenden Moleküls kann  $P(\theta)$  bei hinreichend kleinen Streuwinkeln approximiert werden:

$$\lim_{\theta \rightarrow 0} P(\theta) = 1 - \frac{\mu^2}{3} \langle s^2 \rangle$$

Gleichung 16

wobei  $\mu = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$  der Streuvektor und  $\langle s^2 \rangle$  der mittlere quadratische Trägheitsradius, welcher den mittleren Abstand der Molekülsegmente vom Molekülschwerpunkt beschreibt, sind [58]. Alle obigen Gleichungen gelten für monodisperse Polymermoleküle. Für polydisperse Polymere ist  $M$  in Gleichung 14 durch  $M_w$ , und der Partikelformfaktor bzw. der mittlere quadratische Trägheitsradius durch die jeweiligen z-Mittel  $P_z(\theta)$  bzw.  $\langle s^2 \rangle_z$  zu ersetzen.

Bei klassischen statischen Batchexperimenten werden die Streuintensitäten der Polymerlösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei mehreren Streuwinkeln gemessen.  $M_w$  erhält man dann als Achsenabschnitt für  $R(\theta) = 0$  nach einer doppelte Extrapolation auf  $c = 0$  und  $\theta = 0$ .  $\langle s^2 \rangle$  ergibt sich aus der Steigung der Winkelabhängigkeit der Streuintensität bei kleinen  $c$ .  $A_2$  resultiert aus der Steigung der Konzentrationsabhängigkeit der Streuintensität bei kleinen  $\theta$ . Für die Auswertung von Lichtstreuemessungen verwendet man oftmals den sogenannten Zimm-Plot [59], mit dem beide Extrapolationen in einer einzigen Grafik dargestellt werden können. Auf den Zimm-Plot soll hier nicht näher eingegangen werden, da diese Auftragung in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurde.

Im Gegensatz zu Batchmessungen wird bei der SEC-MALLS-Kopplung die Probe vor der Lichtstreuung mittels SEC in bezüglich des hydrodynamischen Volumens (bzw. der Molmasse) nahezu monodisperse Fraktionen getrennt. Somit kann die Gleichung 14 in erster Näherung in ihrer ursprünglichen Form verwendet werden, wobei zusätzlich der Term  $A_2cM$  aufgrund der sehr kleinen Konzentrationen, die in der SEC am Detektor resultieren, vernachlässigt werden kann. Somit geht die Gleichung 14 bei SEC-MALLS in die folgende Gleichung über:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)r^2}{I_0} = KcMP(\theta)$$

Gleichung 17

Der Geräteaufbau bei der SEC-MALLS-Kopplung ist in Abb. 7 dargestellt.

Der Aufbau besteht aus einer konventionellen SEC-Anlage mit einem Lösungsmittelbehälter, Degasser, Pumpe, Injektor, Säule(n) und einem oder mehreren Konzentrationsdetektoren (z.B. UV-Detektor oder RI-Detektor), wobei der MALLS-Detektor (in Abb. 7 DAWN-EOS) zwischen der Säule und dem RI-Detektor geschaltet wird. Nach der Probeninjektion werden die Polymerketten in der Säule bezüglich des hydrodynamischen Volumens in engverteilte Polymerfraktionen aufgetrennt. Diese gelangen zunächst in den Lichtstreuendetektor. Während sie durch eine Glasdurchflusszelle in diesem Detektor fließen, werden die Streuintensitäten bei unterschiedlichen Beobachtungswinkeln in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen gemessen. Nach dem MALLS-Detektor gelangen die Fraktionen in den RI-Detektor, wo die



Konzentrationen der eluierenden Polymerfraktionen  $c_i$  nach Gleichung 18 bestimmt werden können:

$$c_i = \frac{S_i(\text{RI})}{A_{\text{RI}} \frac{dn}{dc}}$$

Gleichung 18

wobei  $S_i(\text{RI})$  das RI-Detektorsignal der gerade eluierenden Fraktion,  $A_{\text{RI}}$  die Gerätekonstante des RI-Detektors und  $dn/dc$  das schon früher erwähnte Brechungsindexinkrement darstellen [58].

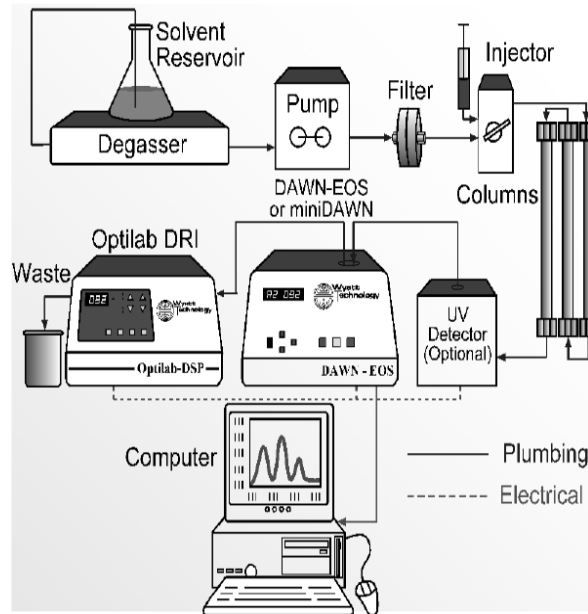


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines SEC-MALLS Systems (mit freundlicher Genehmigung von Wyatt Technology Europe).

Mit bekannter Konzentration  $c_i$  und bekanntem  $dn/dc$  können die Molmassen jeder einzelnen eluierenden Fraktion  $M_i$  nach Gleichung 17 durch die Extrapolation der erhaltenen Streuintensitäten auf den Streuwinkel  $\theta = 0$  erhalten werden. Hierbei wird angenommen, dass  $dn/dc$  unabhängig vom Elutionsvolumen und damit vom Molekulargewicht ist, was für die meisten Homopolymere und viele Copolymere tatsächlich der Fall ist [59]. Aus der Steigung der Winkelabhängigkeit kann  $\langle s_i \rangle^2$  unabhängig von  $dn/dc$ ,  $M$  und der Konzentration für jede chromatographische Fraktion [59] bestimmt werden.

Aus der Abhängigkeit der ermittelten Molmassen vom Elutionsvolumen kann eine SEC-Kalibrierkurve erstellt werden, auf deren Basis zusammen mit dem RI-Chromatogramms die komplette Molmassenverteilung der Probe und daraus alle Molmassenmittelwerte berechnet werden können.

Da weiterhin zu jedem Molekulargewicht auch der Trägheitsradius  $\langle s^2 \rangle$  bekannt ist, können aus dem Skalierungsexponenten  $a_s$  der Relation  $\langle s^2 \rangle \sim M^{a_s}$  Informationen über die Konformation der Polymermoleküle in der Lösung erhalten werden.

Weiterhin lassen sich durch den Vergleich der Trägheitsradien von linearen und verzweigten Molekülen bei einem bestimmten Molekulargewicht Informationen über den Verzweigungsgrad gewinnen.

Die RI-Konstante  $A_{RI}$  kann i.A. durch Messung einer Probe mit bekanntem  $dn/dc$  und Konzentration nach Gleichung 18 bestimmt werden. Dann kann für die untersuchende Probe mittels SEC-MALLS neben der Molmasse auch  $dn/dc$  bestimmt werden, wenn eine genau bekannte Probenmenge injiziert wurde und eine vollständige Wiederfindung gegeben ist. Dies ist besonders dann wichtig, wenn kein Wert für  $dn/dc$  in der Literatur gefunden wird. Allerdings muss beachtet werden, dass oftmals der Lichtstreu- und der RI-Detektor unterschiedliche Wellenlängen verwenden.

Die gleichzeitige Bestimmung von  $dn/dc$  unter Verwendung des RI-Detektors hat gegenüber Batchexperimenten einen wichtigen Vorteil, da die berechneten Molmassen nur linear von  $dn/dc$  beeinflusst werden, während bei Batchmessungen ein quadratischer Zusammenhang existiert. Daher wirken sich fehlerhafte  $dn/dc$ -Werte bei den SEC-MALLS-Messungen weniger stark auf die Molmassen aus als bei den Batchmessungen.

### *Adsorptionschromatographie*

Im Gegensatz zur SEC beruht der Trennmechanismus der Adsorptionschromatographie (LAC) nicht auf entropischen Effekten, sondern wird hauptsächlich durch enthalpische Wechselwirkungen (Coulombwechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Wechselwirkungen) der Polymermoleküle mit der stationären Phase hervorgerufen. Im Idealfall der reinen LAC wird  $\Delta S = 0$  angenommen. Dann vereinfacht sich die Gleichung 2 zu:

$$K_D = K_{LAC} = \exp(-\Delta H/RT)$$

Gleichung 19

Für einen adsorptiven Prozess ist  $\Delta H < 0$ , daher gilt  $K_{LAC} > 1$ .

Um enthalpische Wechselwirkungen zwischen den gelösten Polymermolekülen und der stationären Phase zu ermöglichen, muss der Eluent bei der LAC ein thermodynamisch schwacher Eluent sein. Bei der SEC hingegen sollte ein thermodynamisch guter Eluent eingesetzt werden, der keine enthalpischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase zulässt [54].

Die Annahme  $\Delta S = 0$  ist in der Realität nie gegeben, wodurch im realen Experiment oftmals Adsorptions- und Größenausschlusseffekte überlagert sind.

Für das Elutionsvolumen in der LAC gilt:

$$V_R = V_A + K_{SEC} V_p + K_{LAC} V_{Stat}$$

Gleichung 20

wobei  $V_{Stat}$  das für die Trennung (aufgrund der Adsorption) zugängliche Volumen der stationären Phase ist.

Im Falle eines Homopolymeren gilt, dass in einem Polymermolekül mit einem großen Molekulargewicht mehr Einheiten, die für eine Adsorption zur Verfügung stehen, vorhanden sind, als in einem Polymermolekül mit einem kleineren Molekulargewicht. Daher adsorbieren große Moleküle stärker auf der stationären Phase und eluieren folglich später als kleinere. Hieraus resultiert eine, verglichen mit der SEC, umgekehrte Elutionsreihenfolge bezüglich der Molmassen, d.h. das Elutionsvolumen steigt mit dem Molekulargewicht an. Das Adsorptionsverhalten von Polymeren lässt sich nach Glöckner durch einen multiple attachment Mechanismus erklären [50]. Dieser erklärt auch warum es sogar bei schwachen Wechselwirkungen der Wiederholungseinheiten mit der stationären Phase für hochmolekulare Polymere recht schnell zu einer irreversiblen Adsorption kommt.

Aufgrund der Molmassenabhängigkeit der Retention resultieren schon bei Homopolymeren in der LAC oft breite Peaks, weswegen es zu deren Überlagerungen kommen kann und weswegen chemisch unterschiedliche Spezies bei Copolymeren gar nicht voneinander unterschieden werden können. Zusammenfassend kann man sagen, dass die isokratische Adsorptionschromatographie LAC lediglich zur Trennung von oligomeren Proben mit geringer Polydispersität geeignet ist. Für hochmolekulare und deutlich polydisperse Proben wird meistens die Gradientenchromatographie eingesetzt.

Die Gradientenchromatographie basiert ebenfalls auf Adsorptionseffekten der Polymermoleküle an der stationären Phase, allerdings wird die Eluentenzusammensetzung nicht konstant gehalten, sondern wird im Laufe des chromatographischen Experimentes systematisch verändert. Wie erwähnt, wird die Gradientenchromatographie verwendet, wenn die Probe bei der isokratischen Elution nicht oder nur unvollständig von der stationären Phase eluiert. Das Gradientenexperiment startet in der Regel mit einem thermodynamisch schlechten Eluenten. Die Probe adsorbiert daher nach der Injektion an der stationären Phase. Anschließend wird der Anteil des guten Eluenten systematisch erhöht, so dass auch die stark adsorbierten Komponenten der Probe entsprechend ihrer Adsorptionsstärke eluieren können.

Auch in der Gradientenchromatographie existiert eine Molekulargewichtsabhängigkeit des Elutionsvolumens. Diese ist allerdings nur für niedermolekulare Probenbestandteile stark ausgeprägt und verschwindet für höhere Molmassen. Da hochmolekulare Polymere in der Gradientenchromatographie nahezu unabhängig von ihrem Molekulargewicht eluieren, können hochmolekulare Homopolymere unterschiedlicher chemischer Natur mittels Gradientenchromatographie voneinander getrennt werden. Für hochmolekulare Homopolymere liegt dabei die Eluentenzusammensetzung zum Zeitpunkt der Elution nahe an der Eluentenzusammensetzung am kritischen Punkt der Adsorption (siehe unten) [60, 61]. Niedermolekulare Proben eluieren aufgrund ihrer schwachen Adsorption noch bevor die kritische Eluentenzusammensetzung erreicht wird, wodurch es für geringe Molmassen, wie erwähnt, zu einer molmassenabhängigen Elution kommt. Die Molekulargewichtsabhängigkeit ist in steileren Gradienten schwächer ausgeprägt als in flacheren [60, 61].

Brun [61] konnte zeigen, dass nicht nur für Homopolymere, sondern auch für statistische Copolymere ein kritischer Punkt (siehe unten) existiert. Die Eluentenzusammensetzung am kritischen Punkt hängt dabei von der Comonomerzusammensetzung ab. Da, wie oben

erwähnt, hochmolekulare Polymere im Gradienten nahe an der Eluentenzusammensetzung am kritischen Punkt der Adsorption eluieren, können Copolymere im Gradienten nach ihrer chemischen Zusammensetzung (Comonomerzusammensetzung) getrennt werden, was zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität (nach Definition in vorliegender Arbeit Heterogenität 1. Ordnung) von Copolymeren verwendet werden kann [62].

### *Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption*

Am Übergang der SEC zur LAC gibt es einen sehr engen Bereich, in dem sich die entropischen und enthalpischen Effekte exakt kompensieren. Es gilt  $\Delta H = T\Delta S$  oder  $\Delta G = 0$ . Folglich gilt nach Gleichung 2:

$$K_D = K_{LC-CC} = 1$$

Gleichung 21

Chromatographie unter diesen Bedingungen wird als die Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC) bezeichnet. Der kritische Punkt ist von vielen Faktoren abhängig (stationäre Phase, mobile Phase, Temperatur, Art der Polymere) und ist somit sehr spezifisch.

In der LC-CC eluieren unfunktionalisierte lineare Homopolymere einer bestimmten chemischen Struktur unabhängig von ihrem Molekulargewicht bei gleichem Retentionsvolumen  $V_R = V_A + V_p$ . Wenn eine Probe Polymerketten mit unterschiedlichen Endgruppen enthält, ist es möglich, diese Ketten zu trennen, wenn sich die Wechselwirkungsenergien der Endgruppen hinreichend unterscheiden [63, 64]. Außerdem können lineare und cyclische Polymere gleicher Molmassen mittels Chromatographie am kritischen Punkt der Adsorption getrennt werden [64, 65]. Auch lassen sich am kritischen Punkt der Adsorption Blocklängen eines Blockes in Blockcopolymeren bestimmen. Hierbei wird durch das Arbeiten am kritischen Punkt der Adsorption eines Blockes dieser „chromatographisch unsichtbar“ gemacht. Da dieser nun keinen Beitrag mehr zur Retention bringt, bestimmt somit nur der andere Block das Retentionsverhalten. Wenn dieser zweite Block im SEC-Modus eluiert, dann kann dessen Länge unter Verwendung einer geeigneten SEC-Kalibrierkurve, die unter identischen Bedingungen erstellt wurde, bestimmt werden [66].

In Abb. 8 sind die Molekulargewichtsabhängigkeiten des Elutionsvolumens für die genannten chromatographischen Modi graphisch dargestellt.

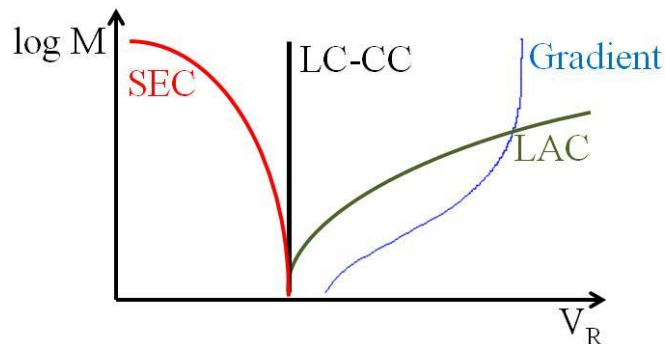


Abb. 8: Schematische Darstellung der Molekulargewichtsabhängigkeit des Elutionsvolumens für unterschiedliche chromatographische Modi.

In der SEC eluieren zuerst Polymere mit dem großen Molekulargewicht und dann diejenigen mit kleineren Molekulargewichten. Die LC-CC zeigt eine molmassenunabhängige Elution. In der LAC eluieren Polymermoleküle mit kleinem Molekulargewicht zuerst, gefolgt von den Molekülen mit großen Molekulargewichten. Die Gradientenchromatographie schließlich zeigt bei kleinen Molekulargewichten eine Molekulargewichtsabhängigkeit der Retention, die für hohe Molekulargewichte nahezu verschwindet.

### 3.2 Kopplung der Chromatographie mit der FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie ist eine Standardmethode in der Polymercharakterisierung und kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung mittlerer Zusammensetzungen von Polymeren verwendet werden. Da die FTIR-Spektroskopie sehr empfindlich ist, kann sie online bzw. semi-online mit der Chromatographie gekoppelt werden. Dabei können Probenkomponenten anhand ihrer spezifischen Banden im FTIR-Spektrum identifiziert und quantifiziert werden. Außerdem lassen sich anhand charakteristischer Banden Änderungen der chemischen Zusammensetzung entlang des Elutionsprofils verfolgen.

Es sind sowohl Kopplungen der FTIR-Spektroskopie mit der SEC als auch mit der Wechselwirkungschromatographie bekannt. Durch SEC-FTIR-Kopplung können Korrelationen zwischen dem Molekulargewicht und der chemischen Zusammensetzung untersucht werden. So beschrieb Pasch et al. [67] die Charakterisierung von Polymerblends aus Polystyrol und Poly(phenylen)oxid. Willis et al. [68] verwendeten die SEC-FTIR-

Kopplung zur Charakterisierung von Ethylenvinylacetatcopolymeren. Durch Kopplung der Wechselwirkungschromatographie mit der FTIR können chemische Zusammensetzungsverteilungen (chemische Heterogenität) komplexer Polymere untersucht werden. Durch LC-CC-FTIR-Kopplung gelang Pasch et al. [69] die Identifizierung sowie die halbquantitative Charakterisierung eines Blends aus Polystyrol und Styrol-Acrylnitril.

Die ersten Kopplungen der Chromatographie mit der FTIR-Spektroskopie wurden unter Verwendung von Durchflusszellen durchgeführt. Schlechte Signal-Rausch-Verhältnisse, verursacht vor allem durch geringe Probenkonzentrationen und das Lösungsmittel (z.B. Wasser in Trennungen bei Verwendung von Umkehrphasen) führten allerdings zu Schwierigkeiten bei diesen Experimenten und folglich zu ihrer eingeschränkten Verwendung [70].

Um das störende Lösungsmittel vor der FTIR-Messung von der Polymerfraktion zu entfernen wurden verschiedenen Ansätze verfolgt. Der Durchbruch gelangte Gagel und Biemann [71], die ein Aerosol aus dem Eluat des chromatographischen Laufs und heißer Luft bildeten. Das Aerosol wurde dann auf eine rotierende Germaniumscheibe, welche auf der gegenüberliegenden Seite mit Aluminium beschichtet war, gesprüht. Die Aerosolbildung führte dabei zum Verdampfen des Lösungsmittels, während sich die nicht verdampfbaren polymeren Komponenten auf der Germaniumscheibe abschieden. Anschließend wurden FTIR-Spektren entlang der gesprühten Polymerspurauf der Scheibe im Reflexionsmodus aufgenommen. Später entwickelte Lab Connections Inc. basierend auf der Erfindung von Gagel und Biemann ein kommerzielles Interface, welches heutzutage sowohl in der Forschung als auch in der Routineanalytik zur Charakterisierung von chromatographischen Fraktionen eingesetzt wird [70].

Das wichtigste Element dieses Interfaces (siehe Abb. 9) bildet eine beheizte Düse, die über einer sich bewegende Germaniumplatte positioniert ist. Das Eluat wird beim Durchlaufen der Düse erhitzt. Da der Gegendruck in die Richtung des Düsenendes sinkt verdampft das Lösungsmittel am Düsenausgang. Nichtflüchtige Probenbestandteile, wie z.B. Polymere, scheiden sich dabei auf der Germaniumplatte ab. Aufgrund der Plattenbewegung werden Fraktionen, die bei unterschiedlichen Zeiten die Säule verlassen, an unterschiedlichen Positionen der Germaniumplatte abgeschieden. Nach dem chromatographischen Experiment wird die Germaniumplatte in eine motorbetriebene optische Einheit eines konventionellen

FTIR-Spektrometers gebracht. Dieses optische Interface besteht aus einer Reihe von Spiegeln, die den FTIR-Strahl auf die Germaniumplatte und dann weiter zum FTIR-Detektor lenken. Die untere Seite der Germaniumplatte ist mit Aluminium beschichtet, so dass der FTIR-Strahl zunächst die Probe auf der Platte passiert und dann an der Aluminiumoberfläche reflektiert wird. Danach passiert der Strahl erneut die Probe und wird schließlich in den Detektor geleitet. Auf diese Weise wird eine doppelte Durchstrahlung der Probe erzielt. Da der Motor die Germaniumplatte bewegt, kann diese abgescannt werden, so dass lösungsmittelfreie Spektren individueller chromatographischer Fraktionen erhalten werden können. Auf diese Weise kann die Änderung der chemischen Zusammensetzung mit der Elutionszeit im chromatographischen Experiment verfolgt werden.

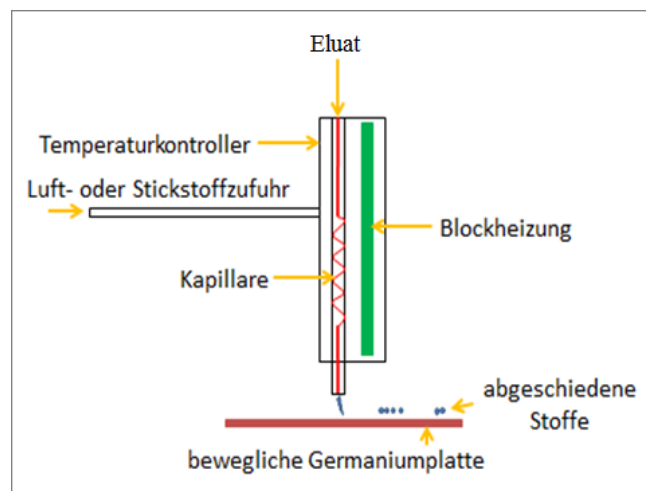


Abb. 9: Funktionsweise des LC-Transform Interfaces.

### 3.3 Grundlagen der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie

Komplexe Polymere weisen mehrdimensionale Verteilungen auf. In einer Probe können gleichzeitig zwei oder mehr der folgenden Verteilungen auftreten: eine Molekulargewichtsverteilung, eine chemische Zusammensetzungsverteilung, eine Funktionalitäts(Endgruppen)verteilung und/oder eine Architektur(Topologie)verteilungen. Alle diese Verteilungen sowie ihre Korrelationen untereinander können Einfluss auf die Eigenschaften von Polymeren haben. Die Charakterisierung der komplexen Verteilungsfunktionen einer solchen Polymerprobe erfordert multidimensionale Charakterisierungsmethoden.



Die 2D-Chromatographie ist dafür bekannt, dass sie simultan nach zwei unterschiedlichen Parametern trennen kann und so zwei Eigenschaftsverteilungen (Heterogenitätsarten) bestimmen kann. Dabei werden zwei flüssigchromatographische Methoden miteinander gekoppelt, so dass die Probe zunächst in der ersten Dimension überwiegend nach einem Parameter (z.B. chemische Zusammensetzung) fraktioniert wird. Anschließend werden die erhaltenen Fraktionen in der zweiten Dimension bezüglich eines anderen Trennparameters (z.B. Molmasse) getrennt. Dabei können, wie schon gesagt, die beiden Eigenschaftsverteilungen simultan bestimmt werden. Außerdem können Korrelationen zwischen den beiden Trennparametern (für dieses Beispiel chemische Zusammensetzung und Molekulargewicht) identifiziert werden. Um Korrelationen untersuchen zu können, sollen die beiden gekoppelten Trennverfahren idealerweise orthogonal zueinander sein, d.h. jeweils unabhängig vom Trennparameter in der anderen Dimension. Dies ist allerdings nicht zwingend erforderlich. In vielen Fällen reicht es aus wenn eine eindimensionale Methode überwiegend nach einem der beiden Parameter trennt, und der Einfluss des anderen Parameters deutlich schwächer ausgeprägt ist.

Wenn zwei Methoden miteinander gekoppelt werden sollen, muss zunächst überlegt werden, welche der Methoden in der ersten und welche in der zweiten Dimension eingesetzt werden soll. Im Falle der Kopplung der Gradientenchromatographie, die zur Untersuchung der chemischen Heterogenität eingesetzt wird, und der SEC, die zur Untersuchung der Molekulargewichtsheterogenität verwendet wird, ist es vorteilhafter die Gradientenchromatographie in der ersten und die SEC in der zweiten Trenndimension zu verwenden [70, 72], da in der Gradientenchromatographie mehr Parameter (mobile und stationäre Phase, Temperatur, organischer Modifier, andere Zusätze) zur Verfügung stehen, um die Trennung selektiver zu gestalten. Hieraus resultieren homogenere (bezüglich chemischer Zusammensetzung) Fraktionen. Die SEC trennt primär nach dem hydrodynamischen Volumen, welches nicht nur von der Molmasse, sondern auch von anderen Faktoren wie der chemischen Zusammensetzung oder der Architektur beeinflusst wird. Eine Optimierung der SEC-Trennung zum Erhalt einer rein molmassenabhängigen Trennung nicht möglich. Einen weiteren Vorteil der Gradiententrennung als erste Dimension liegt darin, dass die in der Gradientenchromatographie verwendeten Trennsäulen meist mit deutlich höheren Probenmengen als die SEC-Säulen beladen werden können ohne dass die Trennung zu sehr beeinflusst wird.

Grundsätzlich kann die Kopplung zweier chromatographischen Trennungen in zwei Ausführungen erfolgen: offline oder online. Bei der offline Analyse wird das Eluat der ersten Dimension manuell oder mithilfe eines Fraktionators in Fraktionen aufgeteilt. Die erhaltenen Fraktionen werden anschließend nacheinander in die zweite Dimension injiziert und dort analysiert. Bei der online Analyse erfolgen die Trennungen in den beiden Dimensionen simultan. D.h. eine Fraktion aus der ersten Dimension wird in die zweite Dimension injiziert und analysiert, während in der ersten Dimension die nächste Fraktion gesammelt wird. Experimentell kann dies mithilfe eines elektronisch gesteuerten Mehrwegeventils, wie es in Abb. 10 am Beispiel eines Achtportventils gezeigt ist, realisiert werden.

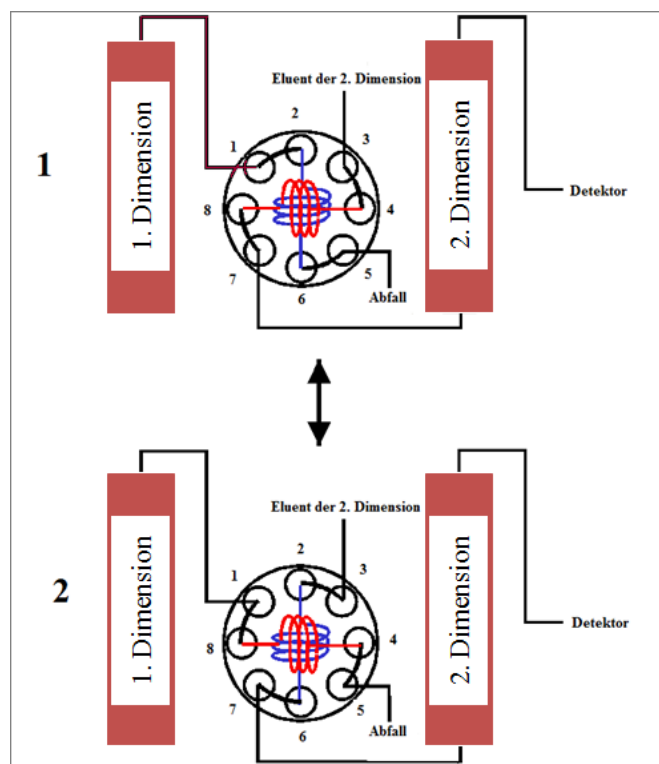


Abb. 10: Funktion eines elektronisch gesteuerten Achtportventils für die 2D flüssigchromatographische Chromatographie. Erklärungen siehe Text.

Die zwei Injektionsschleifen exakt gleichen Volumens sind jeweils mit den Ports 2 und 6 (blaue Schleife) bzw. 4 und 8 (rote Schleife) verbunden. Die restlichen Ports sind wie folgt vergeben:

1 – Säulenausgang der ersten Dimension, 5 – Abfall, 3 – Pumpe des Eluenten der zweiten Dimension, 7 – Säuleneingang der zweiten Dimension. Während die Probe in die erste Trenndimension injiziert wird befindet sich das Ventil in der Position 1 (das obere Bild).

Dabei wird die blaue Injektionsschleife mit dem Eluat der ersten Dimension gefüllt. Wenn dies vollständig erfolgt ist, schaltet das Ventil in die Position 2 um (das untere Bild). Hierdurch wird die blaue Injektionsschleife in den Eluentenverlauf der zweiten Dimension gebracht und ihr Inhalt auf die Säule der zweiten Dimension injiziert. Gleichzeitig wird die rote Injektionsschleife mit dem Eluat der ersten Dimension gefüllt. Wenn die rote Schleife vollständig gefüllt ist, schaltet das Ventil wieder in die Position 1 um. Durch eine periodische Schaltung des Ventiles zwischen den beiden Positionen kann das gesamte Eluat der ersten Dimension völlig automatisch in der zweiten Dimension analysiert werden. Ein Detektor, welcher an den Säulenausgang der zweiten Dimension angeschlossen ist, vermisst deren Eluat. Auf diese Weise erhält man simultan durch eine einzige Analyse Informationen über die Verteilung beider Trennparameter (z.B. chemischer Zusammensetzung und Molmasse) über die Probe. Außerdem lassen sich Korrelationen zwischen den beiden Trennparametern in der Probe untersuchen (siehe oben).

Die online Analyse hat gegenüber der offline Methode einen wichtigen Vorteil, in dem sie vollkommen automatisiert abläuft, wodurch die Ergebnisse weniger anfällig gegen Fehler des Operators sind. Gleichzeitig lassen sich Fehler wie Verdampfung des Lösungsmittels vermeiden, was insbesondere bei quantitativen Auswertungen von Bedeutung ist, da ein direkter Transport zwischen den beiden Dimensionen gewährleistet ist. Dies führt dazu, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei dieser Methode meist besser ist als bei der offline Analyse. Dazu kommt noch, dass durch das System verursachte Elutionsvolumenverschiebungen in der ersten Dimension (z.B. aufgrund von Flussratenänderungen) in der online Analyse sofort detektiert und berücksichtigt werden können. Bei der offline Analyse dagegen führen solche Elutionsvolumenverschiebungen in der ersten Dimension zu Rückvermischungen der erhaltenen Fraktionen während der wiederholten Fraktionierung (siehe unten), wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können. Diese Fehler können nur nach mehreren Wiederholexperimenten entdeckt werden.

Allerdings muss für eine erfolgreiche online Analyse eine Reihe von Bedingungen erfüllt sein. Aufgrund des direkten Transportes der Probe zwischen den Dimensionen, sollen in der ersten Dimension entsprechend hohe Probenmengen vorliegen, damit nach der wiederholten Verdünnungen während den beiden Trennungen noch hinreichende hohe Detektorsignale erhalten werden. Dies ist bei der offline Analyse nicht zwingend erforderlich, da die Möglichkeit besteht in der ersten Dimension wiederholt zu fraktionieren und auf diese Weise

genügend Substanz für die Injektion in die zweite Dimension zu erhalten. Bei der online Messung müssen die Methoden in den beiden Trenndimensionen aufeinander abgestimmt werden. D.h. die verwendeten Eluenten sollen miteinander mischbar sein, damit es nicht zur Phasenseparation während der Injektion in die zweite Dimension kommt. Bei der offline Analyse besteht hingegen die Möglichkeit des Lösungsmittelaustausches durch Abdampfen des Lösungsmittels aus der ersten Dimension. Weiterhin müssen bei online Messungen die Flussraten in den beiden Trennmethode so aufeinander abgestimmt werden, dass die Zeit, die zum Füllen einer Injektionsschleife benötigt wird, exakt mit der Analysezeit der zweiten Dimension übereinstimmt. Bei der offline Analyse bestehen aus dieser Sicht keine Einschränkungen für die Flussraten.

Aufgrund der wiederholten Verdünnung in den beiden Trenndimensionen bei einer online Analyse muss der Detektor sehr empfindlich sein. Die folgenden Detektoren können eingesetzt werden: ELSD (evaporative light scattering detector), FTIR-Detektor (via LC Transform Interface), UV/VIS-Detektor und CCA-Detektor (corona charged aerosol detector). Da bei der offline Analyse die Möglichkeit der mehrfachen Fraktionierung besteht, können hier auch weniger empfindliche Detektoren eingesetzt werden (z.B. RI-Detektor).

Die Ergebnisse 2D-Trennungen können auf verschiedenen Weisen visualisiert werden. Zum einen kann dies mithilfe eines dreidimensionalen Koordinatensystems erfolgen, wobei auf der X-Achse das Elutionsvolumen der SEC (zweite Dimension), auf der Y-Achse das Elutionsvolumen in der Gradientenchromatographie (erste Dimension) und auf der Z-Achse die Detektorsignalintensität aufgetragen wird (siehe Abb. 11, links). Weiterhin können Ergebnisse in Form eines Konturplots dargestellt werden (siehe Abb. 11, rechts). Die Detektorsignalintensität wird dabei farbkodiert dargestellt.

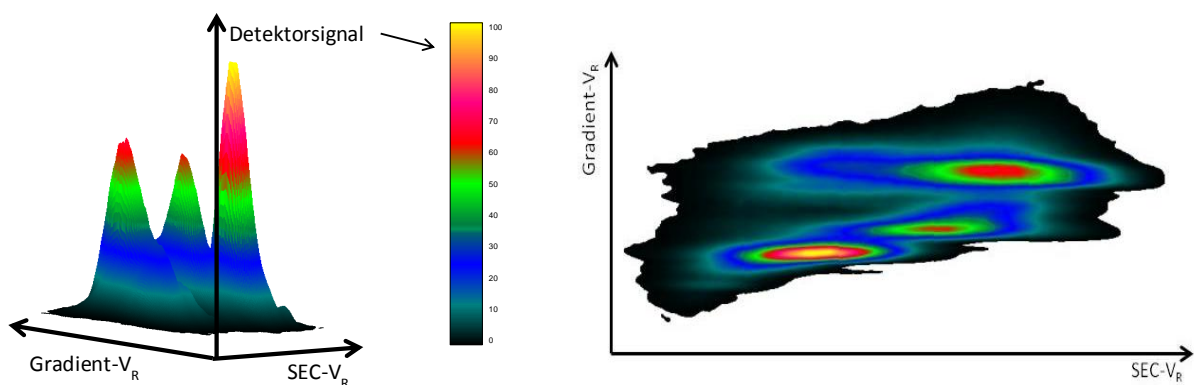


Abb. 11 : Mögliche Visualisierungsmethoden von 2D-Trennungen.

Die zweidimensionale Chromatographie wurde bereits erfolgreich für die Charakterisierung einiger synthetischer Polymeren eingesetzt. Glöckner [73] charakterisierte Poly(Styrol-co-Acrylonitrile) mittels offline 2D-Flüssigchromatographie indem er zunächst die Polymere einer SEC-Trennung unterworfen hatte, wobei diese nach der Molmasse getrennt wurden. Anschließend wurden die chromatographischen Fraktionen bezüglich chemischer Zusammensetzung mittels Hochleistungsfallungschromatographie untersucht. Gerber et al. [74] trennten Mischungen von linearen und sternförmigen Polystyrolen mittels offline Kopplung der Temperaturgradientenwechselwirkungschromatographie (TGIC) in der ersten und der SEC in der zweiten Dimension. Jiang et al. [75] charakterisierten unterschiedlich funktionalisierte PMMAs durch online Kopplung der LC-CC mit der SEC. Raust et al. [76] untersuchte meth(acrylat)basierte Copolymere durch online Kopplung der Gradientenchromatographie mit der SEC. Auch für Cellulosederivate sind 2D chromatographische Untersuchungen bereits publiziert worden. Greiderer et al. [77] verwendeten Gradientenchromatographie auf einer Umkehrphase online gekoppelt mit der SEC zur simultanen Untersuchung der chemischen Zusammensetzungsverteilung und der Molekulargewichtsverteilungen in Hydroxypropylmethylcellulosen. Ghareeb et al. [78] verwendeten die offline 2D-Flüssigchromatographie (Gradientenchromatographie auf einer Normalphase als erste und SEC als zweite Dimension) zur simultanen Bestimmung von DS- und Molmassenverteilungen in Celluloseacetaten.

### **3.4 Verwendete Ionenchromatophiemechanismen zur Trennung von monomeren Carboxymethylglucosen**

#### *Anionenaustauschchromatographie*

Die Anionenaustauschchromatographie wird oft zur Trennung ionischer Verbindungen verwendet. Die Trennung basiert auf einer stöchiometrisch verlaufenden reversiblen Reaktion zwischen positiv geladenen chemisch gebundenen Kationen der stationären Phase und negativ geladenen freien Ionen der mobilen Phase. Dabei kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen. Die stationäre Phase besteht meistens aus Silicagel- oder einer polymerbasierten Matrix mit darauf gebundenen quarternären Ammoniumgruppen. Die Trennung basiert darauf, dass die Anionen der Analytmoleküle und der mobilen Phase leicht unterschiedliche Affinitäten zu den Ammoniumgruppen der stationären Phase besitzen. Während des chromatographischen Prozesses werden zunächst aktive Plätze der stationären

Phase mit Anionen der mobilen Phase belegt ( $E^-$ ). Nach der Probenaufgabe werden diese durch die Analytanionen ausgetauscht ( $A_1^-$ ,  $A_2^-$ ), woraus deren Retention auf der Säule erzielt wird (siehe Abb. 12). Da der Prozess reversibel ist, kommt es immer wieder zu einem Rückaustausch gegen die Anionen des Eluenten. Auf diese Weise werden die Analytmoleküle durch die Säule transportiert. Da die Stärke der Wechselwirkungen der Analytanionen  $A_2^-$  und  $A_1^-$  unterschiedlich sind, werden diese im Laufe des chromatographischen Prozesses aufgetrennt und hinter der Säule getrennt detektiert. Ein wichtiger Punkt dabei ist, dass, wenn die anderen Parameter konstant bleiben, multivalente Analytanionen stärkere elektrostatische Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen als monovalente Analytanionen, und deshalb länger zurückgehalten werden.

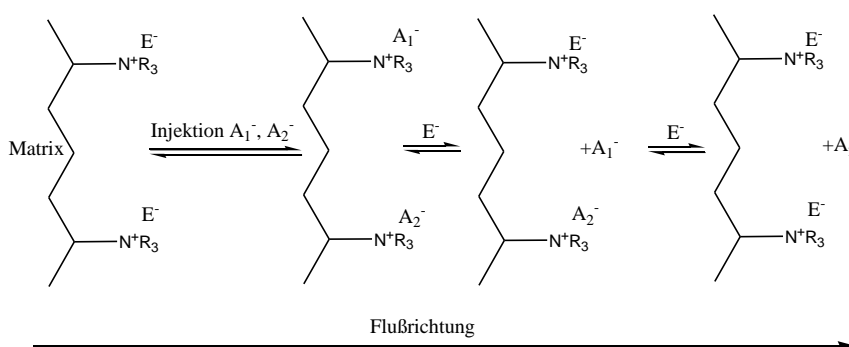


Abb. 12: Der Mechanismus der Anionenaustauschchromatographie.

Als Eluente werden in der Anionenaustauschchromatographie anorganische und organische Säuren bzw. deren Salzlösungen, verwendet. Wichtig ist, dass sich die Affinität der Eluentenanionen nicht zu stark von der Affinität der Analytanionen zu den funktionellen Gruppen der stationären Phase unterscheidet.

### *Ionenausschlusschromatographie*

Die Ionenausschlusschromatographie wird oft zur Trennung schwacher Säuren z.B. Aminosäuren, Carbonsäuren, Alkohole, Kohlenhydrate [79-83] oder seltener zur Trennung von schwachen Basen eingesetzt. Die stationäre Phase besteht aus einem vollständig sulfonierten Kationenaustauscher in seiner sauren ( $H^+$ -) Form. Zwischen der Hydrathülle der stationären Phase und dem Bulk des Eluenten kann man sich eine negativ geladene Donnan-Membran denken (siehe Abb. 13), die nur für ungeladene Moleküle passierbar ist.

Schwache Säuren liegen bei niedrigen pH-Werten nahezu undissoziiert, also ungeladen, vor und können daher die Membran passieren, wodurch sie länger auf der Säule verweilen als starke und damit dissoziierte Säuremoleküle. Starke Säuren hingegen sind vollständig dissoziiert und werden von der stationären Phase abgestoßen (quasi ausgeschlossen) und verweilen auf der Säule nur kurz. Je höher die Dissoziationskonstante des Analytmoleküls ist, desto kleiner ist die Retentionszeit. Die Trennung basiert somit auf unterschiedlichen  $pK_s$ -Werten der Analytmoleküle.

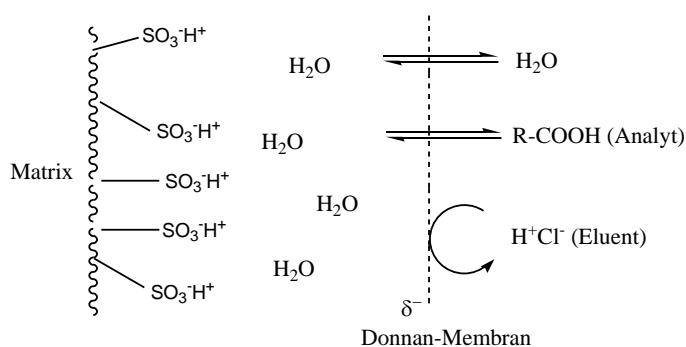


Abb. 13: Ausbildung einer Donnan-Membran in der Kationenaustauschersäule (bestehend aus sulfoniertem Polymermaterial in  $H^+$ -Form) in einer wässrigen mobilen Phasen.

Man erkennt eine Analogie dieser Trennmethode zur Größenausschlusschromatographie, wobei die Trennung allerdings nicht wie bei der SEC auf einem sterischen, sondern auf einem elektrostatischen Ausschluss basiert. Wie in der SEC gibt es auch in der Ionenausschlusschromatographie ein Ausschlussvolumen (entspricht einem bestimmten  $pK_s$ -Wert), unterhalb dessen keine Trennung mehr möglich ist, da alle Moleküle vollständig ausgeschlossen werden. Weiterhin existiert eine Trennschwelle (entspricht auch einem bestimmten  $pK_s$ -Wert), oberhalb dessen keine Trennung mehr möglich ist, da alle Moleküle ungehindert die Membrane passieren können. Moleküle mit  $pK_s$ -Werten zwischen den beiden Extrema können getrennt werden. Wichtig ist bei dieser Methode, dass man die stationäre und die mobile Phasen so wählt, dass eine Adsorption der Analytmoleküle auf der stationären Phase möglichst vermieden wird. Als Eluent wird oft Wasser oder eine verdünnte Mineralsäure (starke Säure) verwendet, wobei zur Trennung von Carbonsäuren Wasser als Eluent eher ungeeignet ist, da es hierbei zur Adsorption auf der stationären Phase kommen kann. Wichtig ist dass die Stärke des Ausschlusseffektes von der Gesamtladung des Analytmoleküls abhängt. Wenn alle anderen Parameter konstant bleiben, werden multivalente Analyte stärker ausgeschlossen als monovalente.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Charakterisierung der Molekulargewichtsverteilung von NaCMCn mittels SEC-MALLS

Zur Entwicklung einer Gradientenchromatographiemethode zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität von NaCMCn sollten die verwendeten Proben zunächst nicht nur bezüglich ihrer mittleren chemischen Zusammensetzung (DS-Werte) charakterisiert werden, sondern auch bezüglich ihrer mittleren Molmassen und Molekulargewichtsverteilungen, da diese beiden Parameter die Retention in der Gradientenchromatographie beeinflussen können. Die DS-Werte der Laborproben Avicel und BWL wurden durch den Hersteller bestimmt und mitgeteilt. Hingegen gab es keine genauen Angaben zu deren Molmassen. Die Information, dass die Avicel-Proben aus mikrokristalliner Cellulose und die BWL-Proben aus Baumwolllinters synthetisiert wurden ließ nur den Schluss zu, dass die beiden Probenserien unterschiedliche Molmassen besitzen sollten. Um die Molmassen und die Molekulargewichtsverteilungen der NaCMCn zu bestimmen, wurden SEC-MALLS-Messungen durchgeführt. Dabei sollte die verwendete SEC-Methode auch für den späteren Einsatz als zweite Dimension in den geplanten 2D-Trennungen geeignet sein, mit denen die Korrelation zwischen der chemischen Heterogenität und der Molmasse in NaCMCn untersucht werden sollte.

#### *Auswahl der mobilen Phase*

An die mobile Phase der SEC als zweite Dimension einer 2D-Trennung werden einige Anforderungen gestellt. Da in der zweiten Dimension sehr kleine Probenkonzentrationen vorliegen und große Flussraten verwendet werden, muss ein empfindlicher und mit großen Flussraten kompatibler Detektor eingesetzt werden. Hierfür wurde in der Vergangenheit oftmals ein ELSD (evaporative light scattering detector) verwendet [75, 84]. Der Einsatz eines ELSD erfordert jedoch die Verwendung einer verdampfenden mobilen Phase. Gleichzeitig soll der in der zweiten Dimension verwendete Eluent aber auch mit dem Eluenten in der ersten Trenndimension (Gradientenchromatographie) sowie mit dem in der zweiten Dimension verwendeten Säulenmaterial kompatibel sein. Einige der mobilen und stationären Phasen, die in der Literatur für die wässrige SEC von NaCMCn beschrieben wurden, sind in Tab. 1 angegeben.



Tab. 1: In der Literatur beschriebene stationäre und mobile Phasen für die wässrige SEC von NaCMCn. Mark-Houwink-Koeffizienten der NaCMCn in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Stationäre Phase	Mobile Phase	Untersuchter DS-Bereich	Mark-Houwink-Koeffizient $a$	Mark-Houwink-Koeffizient $K$ [cm <sup>3</sup> /g]	Literaturquelle
Separom HEMA mono C60 G65; Shodex OH Pak B 804 and B 805	100 mmol/L wässriges NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.80 – 2.90	0.84 (DS 1.37)	0.00138 (DS 1.37)	[21]
TSK 30/40/50/60	100 mmol/L und 500 mmol/L wässriges NaNO <sub>3</sub>	0.71 – 2.95	0.90 (DS 1.00, 10 mmol/L NaCl)	0.0143 (DS 1.00, 10 mmol/L NaCl)	[19]
G6000 PW, G5000 PW and G3000 PW	wässriges NaNO <sub>3</sub>	0.75 – 1.25			[18]
Separon HEMA 1000 (10µm)	400 mmol/L wässriger NaOAc-Puffer	0.70 – 0.80	0.83 (DS 0.76)	0.00224 (DS 0.76)	[20]
	500 mmol/L wässriges NaOH		0.73 (DS 0.76)	0.00537 (DS 0.76)	
TSK G (3000, 4000, 5000, 6000) PW XL	100 mmol/L wässriges NaNO <sub>3</sub> , 200 ppm NaN <sub>3</sub>	1.00 – 1.20	0.74 (DS 1.00) 0.62 (DS 1.20)	0.076 (DS 1.00) 0.344 (DS 1.20)	[22]
Superose 12 HR 10/30	50 mmol/L wässriges NaOH	0.57			[85]
TSK GMPWXL	200 mmol/L wässriger NH <sub>4</sub> OAc-Puffer (pH 5)	0.7			[15]

Alle Systeme in Tab. 1 enthalten niedermolekulare Salze um elektrostatische Wechselwirkungen der geladenen Polymerketten abzuschirmen und deren Aggregation zu reduzieren. Dabei sind alle angegebenen Eluenten, mit Ausnahme der wässrigen NH<sub>4</sub>OAc-Lösung, nicht bei moderaten Temperaturen verdampfbar und entsprechen somit nicht den Anforderungen der ELSD-Detektion für die online 2D-Chromatographie. Da sich NH<sub>4</sub>OAc thermisch (ab 90 °C) in Ammoniak und Essigsäure zersetzt, kann es potentiell als ein ELSD-kompatibles Salz angesehen werden und wurde deswegen im Rahmen dieser Arbeit für die wässrige SEC von NaCMCn verwendet.

Bislang wurde die wässrige NH<sub>4</sub>OAc-Lösung noch nicht für MALLS-Untersuchungen von NaCMCn verwendet. Daher wurden zunächst die mittleren Molmassen und die

Molekulargewichtsverteilungen der NaCMCn mittels SEC-MALLS in wässriger NaCl-Lösung bestimmt, da dieses Lösungsmittel für die MALLS-Untersuchungen der NaCMCn in der Literatur bereits etabliert ist [86-88]. Die so erhaltenen Molmassen galten als Referenzwerte für die nachfolgenden SEC-MALLS-Untersuchungen in wässriger NH<sub>4</sub>OAc-Lösung.

Als nächstes wurden Versuche durchgeführt um eine optimale Salzkonzentration in der mobilen Phase zu bestimmen. Wie es im theoretischen Teil erwähnt wurde, trennt sie SEC nicht direkt nach der Molmasse der Polymerketten, sondern nach dem hydrodynamischen Volumen. Das hydrodynamische Volumen von Polyelektrolyten wie NaCMCn hängt unter anderem auch vom Typ und der Konzentration des niedermolekularen Salzes im Eluenten ab. Diese Abhängigkeit ist allerdings nur bis zu einer bestimmten kritischen Salzkonzentration gegeben, oberhalb derer die elektrostatischen Wechselwirkungen entlang und zwischen den geladenen Polyanionen vollständig abgeschirmt sind und der Polyelektrolyt sich wie ein ungeladenes Polymer verhält. Dies bedeutet, dass das hydrodynamische Volumen nicht mehr durch die Salzkonzentration und den DS-Wert der untersuchten Ketten beeinflusst wird und überwiegend nur das Molekulargewicht die Molekülgröße und somit das SEC-Retentionsverhalten bestimmt. Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen von Polyelektrolyten mittels SEC wird daher bevorzugt oberhalb dieser kritischen Salzkonzentration durchgeführt.

Zur Bestimmung der kritischen Salzkonzentration für NH<sub>4</sub>OAc wurden SEC-Trennungen der NaCMCn unter Variation der NH<sub>4</sub>OAc-Konzentration in der mobilen Phase durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 14 exemplarisch für die Probe Rad 78 dargestellt.

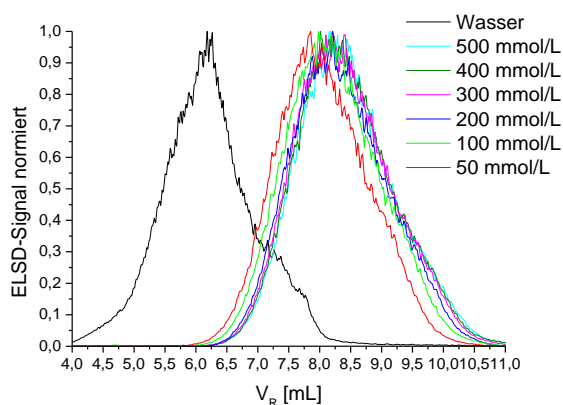


Abb. 14: SEC-Chromatogramme (ELSD-Detektion) der Probe Rad 78 bei unterschiedlichen NH<sub>4</sub>OAc-Konzentrationen im wässrigen Eluenten.

In reinem Wasser wurden sehr hohe hydrodynamische Volumen (bzw. kleine Elutionsvolumen) gefunden. Die Erhöhung der  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Konzentration resultierte in einer Erhöhung des Elutionsvolumens, was auf eine Verringerung der Molekülgröße hindeutet. Ab einer  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Konzentration von 100 mmol/L werden keine signifikanten Änderungen der Chromatogramme mehr detektiert. Daher wurde diese Salzkonzentration in der mobilen Phase für alle weiteren SEC-Untersuchungen verwendet.

#### *Bestimmung der Wiederfindungen der Proben nach der Filtration*

Nachdem die wässrigen mobilen Phasen (100 mmol/L NaCl- bzw. 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung) für die SEC-Untersuchungen mit NaCMCn ausgewählt waren sollte die Wiederfindung nach der Filtration der Proben gravimetrisch untersucht werden, da für die geplanten MALLS-Untersuchungen tatsächliche Probenkonzentrationen unabdingbar sind. Diese Untersuchungen konnten jedoch nur für NaCl durchgeführt werden, da  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ein verdampfbare Salz ist und während der Trocknung partiell verdampfen könnte, was die gravimetrische Bestimmung der Wiederfindung verfälscht. Die ermittelten Filtrationsverluste der NaCMCn in wässrigen  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -haltigen Systemen wurden daher als identisch zu denen in wässriger NaCl-Lösung angenommen.

Alle Avicels sowie BWLs 3 – 6 wurden nach der Filtration nahezu quantitativ (95 – 100 %) wiedergefunden. Nur BWL 1 ( $\text{DS} = 0.46$ ) und BWL 2 ( $\text{DS} = 0.73$ ) zeigten reduzierte Wiederfindungen von 81 bzw. 93 %. Da für diese beiden Proben der DS niedrig ist, scheint die Löslichkeit der hochmolekularen BWL-Proben mit dem DS zu korrelieren. Je höher der Substitutionsgrad ist, desto besser ist die Löslichkeit. Ab einem DS-Wert von ca. 0.9 wird offenbar eine vollständige Löslichkeit im Eluenten und damit die Wiederfindung aller Proben nach der Filtration erreicht. Dieser Effekt ist auch für andere Cellulosederivate bekannt (z.B. Methylcellulose) und wird damit erklärt, dass gering substituierte Ketten aufgrund von intra- bzw. intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen einen cellulose-ähnlichen Charakter besitzen und somit in Wasser als auch in gängigen organischen Lösungsmitteln unlöslich sind. Um nachzuweisen, dass die reduzierte Wiederfindung von BWL 1 und BWL 2 tatsächlich durch den DS bedingt ist, wurden die Substitutionsgrade der Filtrate und Retentate von BWL 1 und BWL 2 mittels HPLC nach vollständigem Kettenabbau bestimmt. Für BWL 1 wurden die folgenden Werte erhalten:  $\text{DS}^{\text{Filtrat}} = 0.49$  bzw.  $\text{DS}^{\text{Retentat}} = 0.17$ . Für BWL 2 wurden die folgenden DS erhalten:  $\text{DS}^{\text{Filtrat}} = 0.72$  und  $\text{DS}^{\text{Retentat}} = 0.24$ . Diese Ergebnisse

zeigen deutlich, dass die ungelösten Anteile kleinere DS-Werte aufweisen als die löslichen. Folglich sind geringer substituierte NaCMC-Ketten unlöslich. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die Proben offenbar Ketten unterschiedlicher DS-Werte enthalten, woraus folgt, dass tatsächlich eine signifikante chemische Heterogenität 1. Ordnung der Proben besteht.

Nach Hoogendam et al. [18] lösen sich NaCMCn schwerer in salzhaltigen wässrigen Lösungen als in salzfreien. Der Grund dafür ist, dass die Anwesenheit des Salzes die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen nicht oder gering substituierten Regionen fördert, was zur Aggregation führt. Es wird daher empfohlen, um die Ausbildung der Aggregate dadurch zu minimieren, NaCMC erst in reinem Wasser zu lösen und dann mit dem Salz zu versetzen, was auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die Lösung wurde dann nach der Salzzugabe filtriert. Aufgrund dieser Vorgehensweise war nicht klar ob die detektierten ungelösten Bestandteile bereits in der wässrigen Lösung anwesend waren oder sich erst nach der Salzzugabe ausbildeten. Um dies zu klären wurden auch die Filtrationsverluste der NaCMCn aus rein wässriger Lösung bestimmt und mit denen in salzhaltiger Lösung verglichen. Die ermittelten Verluste stimmten im Rahmen der Methodengenauigkeit überein. Somit kann man schlussfolgern, dass die Salzzugabe nicht zur Ausbildung zusätzlicher unlöslicher Anteile führte, sondern diese bereits in den rein wässrigen Lösungen anwesend waren.

#### *Auswahl geeigneter Probenkonzentration*

Aus der Literatur ist bekannt [89-91], dass insbesondere für hochmolekulare Proben das SEC-Elutionsvolumen bei hohen Probenkonzentrationen von der gemessenen Probenmenge abhängt. Dabei wird ein Anstieg des Elutionsvolumens mit steigender Probenkonzentration (Probenmenge) beobachtet, was zu fehlerhaften Molekulargewichten führen kann. Zusätzlich zur SEC-Peaklage kann die Peakform durch die Probenkonzentration beeinflusst werden, was zu falschen Molekulargewichtsverteilungen führt. Dieses Phänomen kann mit mindestens zwei Effekten erklärt werden, die entweder einzeln oder gemeinsam auftreten können.

Zum einen ist das hydrodynamische Volumen, welches die eigentliche Trenngröße in der SEC darstellt, eine Funktion der Probenkonzentration via:

$$V_h = \frac{4\pi \cdot [\eta] \cdot M}{9.3 \cdot 10^{24} + 4\pi \cdot 6.022 \cdot 10^{23} \cdot c \cdot ([\eta] - [\eta]_\theta)}$$

Gleichung 22

wobei  $[\eta]$  – intrinsische Viskosität,  $[\eta]_\theta$  – intrinsische Viskosität im  $\theta$ -Lösungsmittel,  $c$  – Polymerkonzentration,  $M$  – Molekulargewicht ist [89].

Somit ergibt sich, dass je höher die Polymerkonzentration ist, desto kleiner ist das hydrodynamische Volumen in Lösung, was zum Anstieg des Retentionsvolumens in der SEC führt. Dieser Effekt ist umso stärker ausgeprägt, je deutlicher das Lösungsmittel der Probe sich vom  $\theta$ -Lösungsmittel unterscheidet oder mit anderen Worten je größer die Differenz  $[\eta] - [\eta]_\theta$  ist. Dieser Effekt wird als Konzentrationseffekt bezeichnet.

Zum anderen kann ein Viskositätseffekt (englisch viscous „fingering“) auftreten [91]. Wenn die Viskosität der injizierten Polymerlösung deutlich höher als die Viskosität der mobilen Phase ist, dann treten Strömungsirreguläritäten bedingt durch die eingeschränkte Diffusion auf, die ihrerseits zu Peakverbreiterungen und Tailings führen können.

Somit sollte bei Konzentrationen gearbeitet werden, bei denen kein oder nur ein vernachlässigbarer Einfluss der Probenkonzentration auf das Elutionsvolumen vorliegt. Um geeignete Probenkonzentrationen zu ermitteln, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Messungen durchgeführt, bei denen die Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen in der SEC vermessen wurden. Dadurch wurden für die beiden Probenserien jeweils eine optimale Probenkonzentration bestimmt, bei welcher einerseits das SEC-Elutionsvolumen und die SEC-Peakform nicht bzw. nur unwesentlich durch die Probenkonzentration beeinflusst werden und andererseits hinreichend intensive MALLS-Signale erhalten werden.

Für diese Messungen wurden für Avicel 5 und BWL 6 jeweils vier unterschiedlichen Probenkonzentrationen 0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L und 3 g/L getestet. In Abb. 15 sind die dabei erhaltenen SEC-Chromatogramme zu sehen. Die resultierenden  $M_w$ -Werte und deren statistischen Fehler, die von der Software anhand des Rauschens der LS- und RI-Signale bestimmt werden, sind in Tab. 2 angegeben. Diese Werte eignen sich zur Bewertung der Genauigkeiten der bestimmten  $M_{ws}$ .

In Abb. 15 können die unterschiedlichen Signalintensitäten in den Chromatogrammen der beiden Proben auf die unterschiedlichen injizierten Probenmengen zurückgeführt werden und sind für die aktuellen Untersuchungen irrelevant. Wichtig hingegen sind die Peaklagen und die Peakformen bei den unterschiedlichen Konzentrationen.

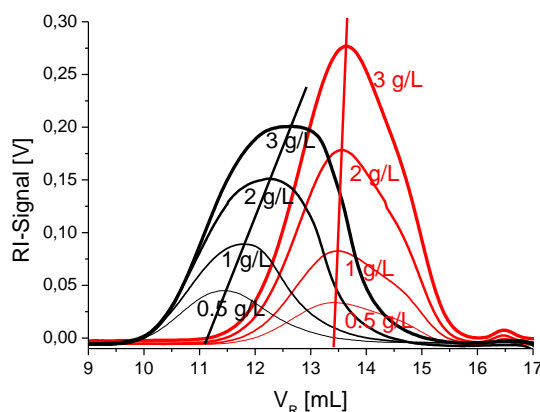


Abb. 15: RI-Chromatogramme erhalten unter Variation der Probenkonzentration: 0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L jeweils für Avicel 5 (rot) und BWL 6 (schwarz). Eluent: 100 mmol/L wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung. Die Geraden verdeutlichen die Variation des Peakmaximums mit der Konzentration.

Wie man erkennt, steigt das Elutionsvolumen der Probe BWL 6 mit steigender Probenkonzentration deutlich an. Auch die Peakform verändert sich. Mit steigender Probenkonzentration wird ein stärkeres Tailing detektiert, welches bei einer Konzentration von 0.5 g/L kaum vorhanden ist. Diese beiden Beobachtungen können auf die oben beschriebenen Effekte zurückgeführt werden. Aus Tab. 2 wird deutlich, dass bei allen verwendeten Konzentrationen für BWL 6 vergleichbare  $M_w$ -Werte resultieren (max. statistischer Fehler 2.5 %). Somit scheint eine Konzentration von 0.5 g/L für die SEC-MALLS-Untersuchungen der BWL-Proben geeignet zu sein, da hierbei der Einfluss der Probenkonzentration auf die Kurvenform und Peaklage am geringsten ist und trotz der geringen Probenkonzentration verlässliche Molekulargewichte mittels SEC-MALLS erhalten werden.

Bei Avicel 5 findet sich ein anderes Verhalten. Hier werden weder signifikante Veränderungen der Kurvenform noch des Elutionsvolumens aufgrund der unterschiedlichen Probenkonzentrationen detektiert. Aufgrund der Peaklage und anhand der Molekulargewichte aus Tab. 2 zeigt sich, dass das Molekulargewicht von Avicel 5 niedriger ist, als das von BWL 6. Die beschriebenen Effekte wirken sich bei niedrigeren Molekulargewichten deutlich

geringer aus, als bei hohen, womit die weitgehende Unabhängigkeit der Peakform und -lage für Avicel 5 erklärt werden kann. Die statistischen Genauigkeiten der mittels Lichtstreuung für Avicel 5 bestimmten  $M_w$ -Werte sind allerdings geringer als die von BWL 6. Besonders für die kleinste Konzentration von 0.5 g/L liegt die vom Programm aufgrund der Signal/Rausch-Verhältnisse berechnete Ungenauigkeit mit 7 % für Avicel 5 deutlich höher als die von BWL 6 (2.5 %). Der  $M_w$ -Wert mit dem geringsten statistischen Fehler resultiert für Avicel 5 bei 3 g/L. Da gleichzeitig für diese Konzentration noch keine ausgeprägte Abhängigkeit der Peakform- und -lage von der Probenmenge besteht, wurde diese Probenkonzentration für die SEC-MALLS-Untersuchungen der Avicel-Proben verwendet.

Tab. 2:  $M_w$ -Werte und statistische Ungenauigkeiten (in Klammern) für Avicel 5 und BWL 6 aus SEC-MALLS bei Verwendung unterschiedlicher Probenkonzentrationen (Chromatogramme siehe Abb. 15). Injektionsvolumen 80  $\mu$ L.

Probenkonzentration [g/L]	$M_w$ (Avicel 5) [g/mol]	$M_w$ (BWL 6) [g/mol]
0.5	58 020 (7 %)	379 800 (2.5 %)
1	50 350 (4 %)	376 500 (1.3 %)
2	51 740 (3 %)	353 900 (1.2 %)
3	47 080 (1.9 %)	335 300 (1.4 %)

#### *Bestimmung der Wiederfindungen der Proben nach der SEC-Trennung*

Um reduzierte Wiederfindungen während der SEC-Analyse auszuschließen bzw. ihr Ausmaß zu quantifizieren, wurden die Wiederfindungsraten der Proben nach der SEC-Trennung quantitativ bestimmt. Kommt es zu einer verringerten Wiederfindung, kann die Einwaagekonzentration nicht mehr als Basis für die MALLS-Auswertung verwendet werden, da die Fläche unter dem RI-Signal nicht mehr die tatsächliche Probenkonzentration widerspiegelt. Dies wiederum resultiert in fehlerhaften Molekulargewichten.

Diese Experimente zur Wiederfindung wurden für die beiden Probenreihen jeweils nur mit der höchst- und niedrigstsubstituierten Probe unter Verwendung des ELS-Detektors und in 100 mmol/L wässriger  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung durchgeführt. Da NaCMCn nur eine sehr geringe UV-Absorption bei den Wellenlängen, bei denen der Eluent UV-durchlässig ist, besitzen, wurde erwartet, dass aufgrund der resultierenden geringen Signal/Rausch-Verhältnisses der

Einsatz eines UV-Detektors zu großen Fehlern führen wird. Gleichzeitig war auch die Verwendung eines RI-Detektors nicht möglich, da es für diesen, wenn keine Säule verwendet wird, zur Überlagerung der Systempeaks mit den Probepeaks kommt, wodurch die Auswertung verfälscht wird.

Für Probenkonzentrationen von 3 g/L bzw. 0.5 g/L für Avicel und 0.5 g/L für BWL wurden die Wiederfindungen ermittelt. Dabei wurde die Wiederfindung auf die jeweils nach der Filtration vorliegende Probenkonzentration bezogen (siehe oben).

Avicel 1 (3 g/L):	$75 \pm 1 \%$	Avicel 1 (0.5 g/L):	$100 \pm 7 \%$
Avicel 5 (3 g/L):	$76 \pm 5 \%$	Avicel 5 (0.5 g/L):	$90 \pm 3 \%$
BWL 1 (0.5 g/L):	$95 \pm 5 \%$		
BWL 6 (0.5 g/L):	$100 \pm 3 \%$		

Für die BWL-Proben konnte im Rahmen der Genauigkeit der Methode eine quantitative Wiederfindung belegt werden. Für die Avicel-Proben bei der Probenkonzentration von 0.5 g/L wurden unerwartet nur ca. 75 % wiedergefunden. Ein Einfluss der chemischen Zusammensetzung auf die Wiederfindung konnte dabei ausgeschlossen werden, da bei vergleichbaren DS-Werten die BWL-Proben vollständig wiedergefunden wurden. Ein Molmasseneffekt ist auch eher unwahrscheinlich, da dieser eher für die hochmolekularen BWLs zu erwarten wäre. Die beobachteten Probenverluste der Avicels auf der Säule könnten daher eventuell durch die hohen Probenkonzentrationen verursacht sein. Um dies zu prüfen, wurden die Wiederfindungen der Avicel-Proben auch bei einer kleineren Probenkonzentration von 0.5 g/L bestimmt. Dabei wurden im Rahmen der Genauigkeit der Methode die Proben nahezu vollständig wiedergefunden, was die Annahme stützt, dass die hohen Probenkonzentrationen tatsächlich die Probenverluste auf der Säule verursachten, in dem sie z.B. die Ausbildung der hochmolekularen Aggregate begünstigten. Derartige Aggregate könnten eventuell aufgrund ihrer Größe nicht durch die Säule transportiert werden. Trotz der beobachteten Probenverluste wurde die 3 g/L für die SEC-MALLS-Untersuchungen der Avicel-Proben verwendet, da bei dieser Konzentration gute Signal/Rausch-Verhältnisse im MALLS-Detektor und verlässliche Molekulargewichte resultierten. Bei der Berechnung der Probenkonzentration am Detektor wurde der reduzierten Probenkonzentration jedoch



Rechnung getragen, in dem sowohl in 100 mmol/L NaCl- als auch in 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung eine Wiederfindung von 75.5 % angenommen wurde.

Nach der Optimierung der experimentellen Bedingungen für die SEC-MALLS-Untersuchungen, wurden alle Avicel- und BWL-Proben in den beiden unterschiedlichen Eluenten vermessen. Die folgenden Kapitel beschreiben die dabei erhaltenen Ergebnisse.

### SEC-Elutionskurven

Die Überlagerungen der SEC-Chromatogramme der Avicels und BWLs in den beiden Eluenten sind in Abb. 16 dargestellt.

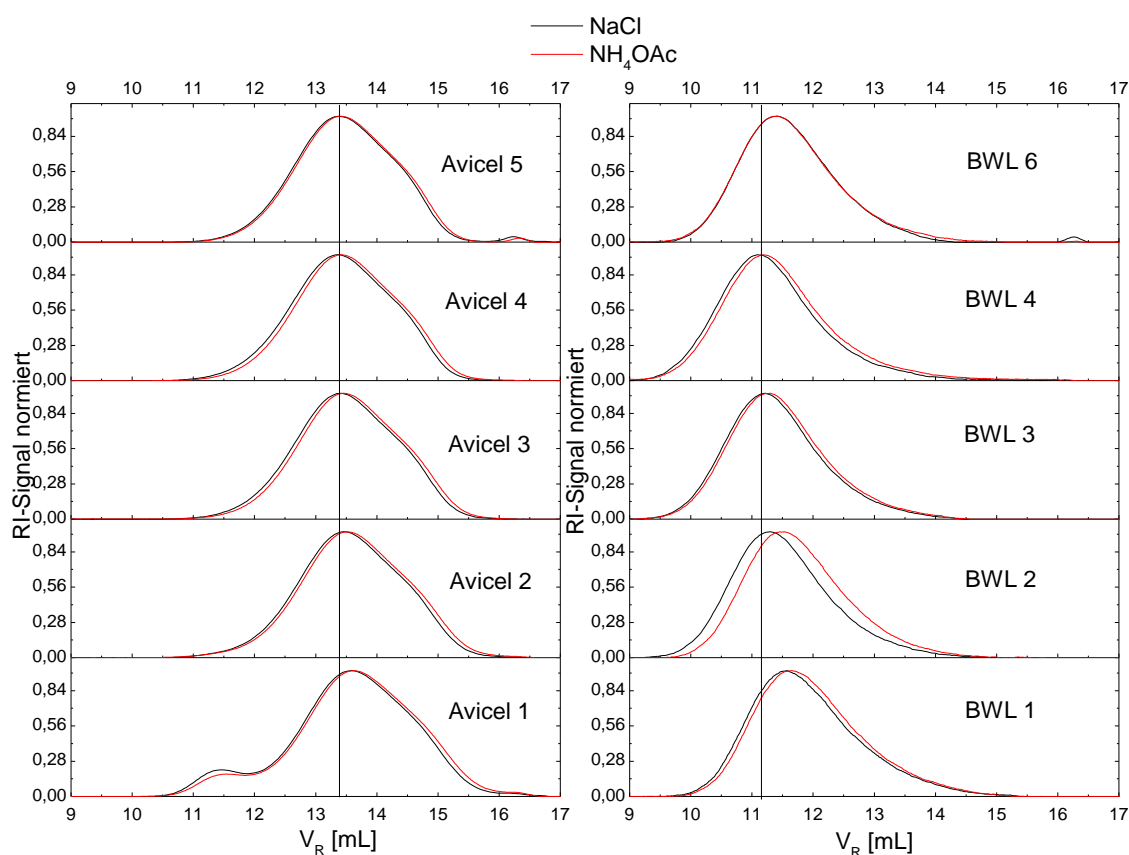


Abb. 16: Überlagerungen der SEC-Chromatogramme der Avicels (links) und BWLs (rechts) in 100 mmol/L wässriger  $\text{NH}_4\text{OAc}$ - (rot) und NaCl-Lösung (schwarz).

Für alle Proben wurden in beiden Eluenten breite Peaks erhalten, was auf breite Molekulargewichtsverteilungen der Proben hinweist. BWLs eluieren dabei zwischen 9,5 und 15 mL und somit früher als Avicels, die in beiden Eluenten zwischen 11 und 16 mL die Säule verlassen. Dies deutet darauf hin, dass BWLs höhere hydrodynamische Volumen und damit

auch höhere Molmassen als die Avicels besitzen. In den Chromatogrammen von Avicel 1 wird ein kleiner Vorpeak zwischen 10.5 und 12 mL detektiert, was eventuell auf die Anwesenheit von Aggregaten in dieser Probe hindeutet.

Wenn die Chromatogramme der Proben in beiden Eluenten miteinander verglichen werden, wird festgestellt, dass die Elutionskurven der Proben in NaCl gegenüber denen in  $\text{NH}_4\text{OAc}$  geringfügig zu kleineren Elutionsvolumen verschoben sind. Dieser Effekt ist für BWL 2 stärker ausgeprägt als für die anderen Proben und deutet auf ein etwas höheres hydrodynamisches Volumen von BWL 2 in NaCl verglichen mit  $\text{NH}_4\text{OAc}$  hin, was zunächst nicht verständlich ist. Wie später gezeigt wird, stimmt dieses Verhalten mit höheren gemessenen  $M_w$ -Werten der BWL 2 in NaCl verglichen mit  $\text{NH}_4\text{OAc}$  überein und resultiert wahrscheinlich aus unterschiedlichen Aggregationsgraden der Probe in den beiden Eluenten.

Schließlich erkennt man in Abb. 16 sowohl in NaCl als auch in  $\text{NH}_4\text{OAc}$  eine geringe Verschiebung der Chromatogramme von BWL 1, 2 und 6 zu höheren Elutionsvolumen verglichen mit BWL 3 und BWL 4, was ebenfalls auf geringfügig unterschiedliche hydrodynamischen Volumen der Proben hindeutet. Die Chromatogramme der unterschiedlich substituierten Avicels sind hingegen nahezu deckungsgleich. Auch korreliert hier das Elutionsverhalten mit den  $M_w$ -Werten (siehe unten), während, wie ebenfalls später gezeigt wird, für BWL 1, 2, und 6 kleinere mittlere Molmassen als für BWL 3 und 4 erhalten werden. Eine mögliche Erklärung für die Peakverschiebung und die geringen Molmassen könnte die Anwesenheit von hochmolekularen unlöslichen Anteilen in den Proben BWL 1 und 2 sein, die vor der chromatographischen Trennung abfiltriert werden. Die löslichen Reste dieser Proben besitzen folglich die kleineren Molmassen als die Originalproben und eluieren dementsprechend später in der SEC als BWL 3 und 4, die keine unlöslichen Anteile enthalten. Gemäß den oben beschriebenen Lösungsversuchen enthält BWL 6 jedoch auch keine unlöslichen Anteile. Die Verschiebung des Chromatogramms dieser Probe zu größeren Elutionsvolumen und die kleinere  $M_w$  (siehe unten) könnten durch einen partiellen Kettenabbau während der Synthese verursacht sein. Dieser kann dadurch verursacht sein, dass BWL 6 in Unterschied zu den anderen BWLs durch eine zweistufige Carboxymethylierung hergestellt wurde.

*Einfluss des DS und des Salzes auf das Brechungsindexinkrement  $dn/dc$* 

Zur Bestimmung der absoluten Molmassen der NaCMCn mit SEC-MALLS sind die Brechungsindexinkremente  $dn/dc$  der Polymere in den verwendbaren Eluenten erforderlich. Während der  $dn/dc$ -Wert von NaCMCn in wässriger NaCl-Lösung aus der Literatur bekannt ist [86-88], waren keine Informationen über  $dn/dc$  in wässriger  $NH_4OAc$ -Lösung verfügbar. Es sollte außerdem die DS-Abhängigkeit der  $dn/dc$ -Werte unbedingt untersucht werden, da, wie aus der Literatur bekannt ist [59], sich dieser Wert mit der Comonomerzusammensetzung ändern kann. Die Comonomerzusammensetzung (in diesem Fall DS) kann sich ihrerseits mit dem SEC-Elutionsvolumen ändern, wenn sie mit dem Molekulargewicht korreliert. Folglich kann sich  $dn/dc$  über den Polymerpeak ändern, was bei den MALLS-Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden sollte. Dies kann dadurch erfolgen, wenn ein RI-Detektor als Konzentrationsdetektor eingesetzt wird. Die Brechungsindexinkremente der eluierenden Polymerfraktionen können in diesem Fall ermittelt werden.

$dn/dc$ -Werte wurden mittels SEC-MALLS nur für die Avicel-Proben bestimmt, da nur Avicels keine Filtrationsverluste zeigten (siehe oben). Lediglich die verringerte Wiederfindung auf der Säule musste hierbei berücksichtigt werden. Die erhaltenen  $dn/dc$ -Werte in beiden Eluenten sind in Tab. 3 angegeben.

Tab. 3:  $dn/dc$  von NaCMCn in 100 mmol/L wässriger NaCl- und  $NH_4OAc$ -Lösung, bestimmt mittels SEC-MALLS.

Probe (DS)	$dn/dc$ in NaCl [mL/g]	$dn/dc$ in $NH_4OAc$ [mL/g]
Avicel 1 (0.45)	0.159	0.153
Avicel 2 (0.75)	0.163	0.178
Avicel 3 (0.98)	0.157	0.157
Avicel 4 (1.23)	0.158	0.156
Avicel 5 (1.54)	0.144	0.140

Es konnten keine signifikanten oder systematischen Änderungen der  $dn/dc$ -Werte für Proben unterschiedlicher DS-Werte detektiert werden. Daher wurde ein über alle Proben und Eluente gemittelter  $dn/dc$ -Wert von 0.156 mL/g sowohl für Avicels als auch für BWLs verwendet. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Wert von Sitaramaiah et al. (0.147 mL/g) für NaCMCn

im Bereich  $DS = 0.66 - 0.73$  in 100 mmol/L wässriger NaCl-Lösung [87]. Der Befund eines DS-unabhängigen  $dn/dc$  wird gestützt durch Berichte, bei welchen für NaCMCn im Bereich  $DS = 0.75 - 1.25$  in 100 mmol/L wässriger  $NH_4NO_3$ -Lösung und in 20 bzw. 100 mmol/L wässriger  $NaNO_3$ -Lösung keine Abhängigkeit des  $dn/dc$  von DS gefunden wurde [18]. Brown et al. [92] registrierten hingegen eine leichte Abnahme der  $dn/dc$ -Werte mit steigendem DS in Cadoxen (Triethylendiamin-Cadmium Hydroxid) als Lösungsmittel im DS-Bereich 0.21 – 0.94. Jedoch unterscheidet sich der in der Arbeit von Brown betrachtete DS-Bereich von dem in der vorliegenden Arbeit ( $DS = 0.45 - 1.55$ ).

#### *Bestimmung der Referenz- $M_w$ in wässriger NaCl-Lösung*

Mithilfe der erhaltenen SEC-Chromatogramme und dem  $dn/dc$ -Wert wurden die Referenz- $M_w$  der NaCMCn in wässriger NaCl-Lösung als Eluenten bestimmt. Diese Werte sind in Tab. 4 wiedergegeben.

Tab. 4:  $M_w$  der NaCMCn in 100 mmol/L wässriger NaCl-Lösung (Referenz- $M_w$ ) und in 100 mmol/L wässriger  $NH_4OAc$ -Lösung, bestimmt mittels SEC-MALLS. Die Werte in Klammern in der dritten Spalte sind die relativen Abweichungen der Werte in  $NH_4OAc$  von den entsprechenden Referenz- $M_w$  in NaCl.

Probe (DS)	Referenz- $M_w$ in NaCl [g/mol]	$M_w$ in $NH_4OAc$ [g/mol]
Avicel 1 (0.45)	392 000	481 000 (23 %)
Avicel 2 (0.75)	43 000	42 000 (-2 %)
Avicel 3 (0.98)	39 000	35 000 (-10 %)
Avicel 4 (1.23)	42 000	39 000 (-7 %)
Avicel 5 (1.54)	46 000	44 000 (-4 %)
BWL 1 (0.46)	236 000	219 000 (-7 %)
BWL 2 (0.73)	341 000	260 000 (-24 %)
BWL 3 (0.95)	386 000	383 000 (-1 %)
BWL 4 (1.25)	481 000	435 000 (-10 %)
BWL 6 (1.55)	318 000	339 000 (7 %)

Die Referenz- $M_w$ -Werte der BWLs sind etwa um den Faktor 5 höher als die der Avicels (ausgenommen Avicel 1), was mit den kleineren SEC-Elutionsvolumen (den höheren hydrodynamischen Volumen) der BWLs verglichen mit den Avicels übereinstimmt. Avicel 1

weist eine deutlich höhere Molmasse auf als die anderen Avicel-Proben, was die Annahme unterstützt, dass in Avicel 1 Aggregate vorliegen. Die Unterschiede zwischen den  $M_w$ -Werten der einzelnen BWL-Proben wurden schon zusammen mit den SEC-Elutionkurven diskutiert.

#### *Bestimmung der $M_w$ in wässriger $NH_4OAc$ -Lösung*

Nachdem die Referenzmolmassen der NaCMCn in wässriger NaCl-Lösung bestimmt waren, wurden diese Werte mit den Molmassen, die in wässriger  $NH_4OAc$ -Lösung erhalten wurden (siehe Tab. 4), verglichen. Mit Ausnahme von Avicel 1 und BWL 2 liegen alle Abweichungen innerhalb von  $\pm 10\%$ . Aufgrund der Erfahrungen in unserem Labor ist dieser Fehler im Bereich der üblichen Fehler der mittels Lichtstreuung bestimmten Molmassen. Die Molmassen in beiden Eluenten stimmen somit im Rahmen der Genauigkeit der Methode überein, besonders wenn man die aus den Fitrationsverlusten und Wiederfindungen resultierenden Fehler berücksichtigt. Folglich kann die wässrige  $NH_4OAc$ -Lösung als Eluent für eine verlässliche Bestimmung der Molmassen von NaCMCn mittels SEC-MALLS angesehen werden. Die für Avicel 1 beobachtete etwas höhere Abweichung ist eventuell auf unterschiedliche Aggregationsgrade in den beiden Eluenten zurückzuführen. Für BWL 2 stimmen die Unterschiede der  $M_w$ -Werte mit den unterschiedlichen SEC-Elutionsvolumen (siehe Abb. 16) in den beiden Eluenten überein, was darauf hindeutet, dass die hydrodynamischen Volumina und die Molmassen der BWL 2 in NaCl etwas höher sind als in  $NH_4OAc$ . Diese Unterschiede für BWL 2 werden höchstwahrscheinlich ebenfalls durch unterschiedliche Aggregationsgrade in den beiden Eluenten verursacht.

#### *SEC-MALLS-Kalibrierkurven*

Mittels SEC-MALLS können nicht nur die mittleren Molmassen der Proben bestimmt werden, sondern es sind auch die absoluten Molmassen der einzelnen eluierenden Fraktionen zugänglich. Daraus lassen sich die SEC-Kalibrierkurven erstellen und somit die wahren Molekulargewichtsverteilungen der Proben berechnen.

In Abb. 17 sind die Überlagerungen der SEC-Kalibrierkurven und der SEC-Chromatogramme für Proben mit vergleichbaren DS-Werten in den beiden Eluenten dargestellt.

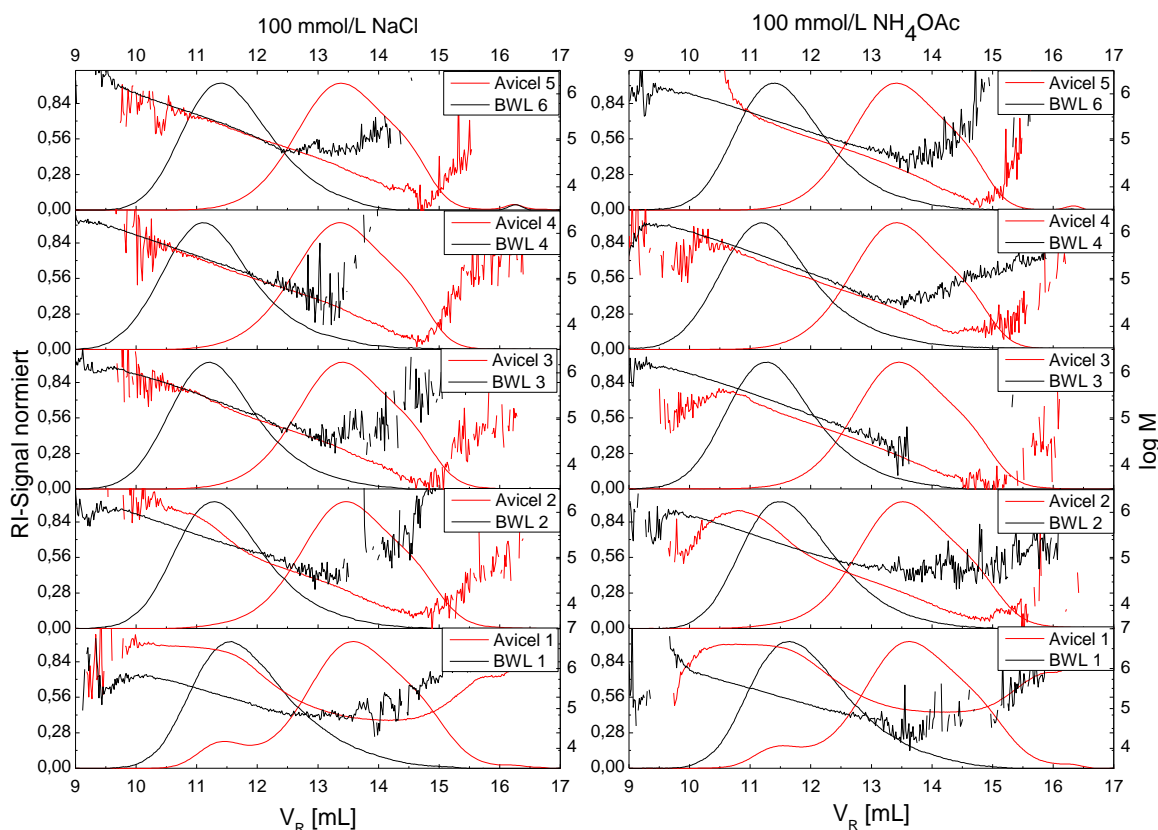


Abb. 17: Überlagerungen der SEC-Kalibrierkurven und SEC-Chromatogramme von Avicels (rot) und BWLs (schwarz) mit vergleichbaren DS-Werten. Links: 100 mmol/L wässrige NaCl-, rechts: 100 mmol/L wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung.

Wie es für eine SEC-Trennung zu erwarten ist, sinken die Molmassen mit steigendem Elutionsvolumen für alle Proben. Ausgenommen hiervon sind Avicel 1 und Avicel 2, bei welchen die Kalibrationskurven jeweils in Elutionsbereichen zwischen 10 – 13,5 mL und 10 – 12 mL signifikant von diesem Verhalten abweichen (dazu mehr im nächsten Abschnitt). Die Streuung der Molmassen an den beiden Flanken der Chromatogramme ist typisch für die SEC-MALLS-Messungen und kann auf die unterschiedlichen Empfindlichkeiten des MALLS- bzw. RI-Detektors zurückgeführt werden. Die Kalibrierkurven der Avicels und BWLs mit vergleichbaren DS-Werten gehen, mit Ausnahme der Paare Avicel 1/BWL 1, Avicel 2/BWL 2 (zwischen 10 – 12 mL) ineinander über, was darauf hindeutet, dass die verwendeten SEC-Methoden tatsächlich die NaCMCn nach ihren Molmassen trennen. Das Ineinanderlaufen wird auch erwartet, wenn diese Paare Proben mit gleicher mittlerer chemischer Struktur repräsentieren, die sich lediglich im Molekulargewicht unterscheiden. Dies jedoch nur unter der Annahme, dass die chemische Heterogenität keinen Einfluss auf das

hydrodynamische Volumen ausübt. Das letzte ist hierbei offensichtlich tatsächlich der Fall, da, wie später gezeigt wird, SEC-Kalibrierkurven aller Proben unabhängig vom DS sind.

Hingegen zeigen die Kalibrierkurven der Proben Avicel 1 und Avicel 2 in beiden Eluenten deutliche Abweichungen von den Kalibrierkurven der entsprechenden BWL-Proben. Somit ermittelt man zu einem gegebenen DS bei einem Elutionsvolumen zwei unterschiedliche Molekulargewichte, abhängig davon, welche Probe zur Bestimmung des Molekulargewichtes herangezogen wird. Dies deutet darauf hin, dass die jeweiligen Avicel- und BWL-Paarungen nicht als identische Proben angesehen werden können, die sich lediglich in ihren Molmassen unterscheiden. Schließlich weichen die Kalibrierkurven von Avicel 1 und Avicel 2 von einem annähernd linearen Verlauf ab und zeigen ausgeprägte Krümmungen. Die gegenüber den anderen Avicel-Proben deutlich höheren  $M_w$ -Werte, die für diese Proben ermittelt wurden, sind die logische Konsequenz dieser Kalibrierkurven. Da dieses Verhalten in beiden Eluenten beobachtet wird, können experimentellen Artefakte ausgeschlossen werden. Dieser Effekt basiert daher auf strukturellen Besonderheiten der Proben selbst. Anhand der Kalibrierkurve von Avicel 1 kann geschlossen werden, dass der kleine Peak, der im RI-Signal zwischen 10.5 und 12 mL gefunden wird, durch Probenanteile mit deutlich höherer Molmasse verursacht wird. Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Sitaramaiah et al. [87], der basierend auf Lichtstreustudien an CMCn in wässriger NaCl-Lösung die Existenz hochmolekularer Aggregate postulierte. Die schon früher vermuteten unterschiedlichen Aggregationsgrade in beiden verwendeten Eluenten führen dann auch zu unterschiedlichen Kalibrationskurven und somit auch zu den unterschiedlichen mittleren Molmassen von Avicel 1 in beiden Lösungsmitteln. Die Menge der Aggregate in Avicel 2 scheint verglichen mit Avicel 1 deutlich kleiner zu sein. Dies kann daraus geschlossen werden, dass bei Avicel 2 der Elutionsbereich, in welchem eine Abweichung der Kalibrierkurve von der extrapolierten Kalibrierkurve der entsprechenden BWL-Probe detektiert wird, kleiner ist (ca. 2 mL) als bei der Avicel 1 (ca. 4 mL). Folglich spiegeln sich die unterschiedlichen Aggregationsgrade in den beiden Eluenten bei Avicel 2 nicht so gravierend bei den mittleren Molekulargewichten wieder, wie es bei Avicel 1 der Fall ist. Zu bemerken ist weiterhin, dass die geringen Aggregatanteile in Avicel 2 nicht im RI-Chromatogramm detektiert werden können. Der Grund liegt darin, dass das RI-Signal nur zur Konzentration der Polymerfraktion proportional ist, während das MALLS-Signal proportional zum Produkt  $cM$  ist. Daher liefert das MALLS-

Signal für die hochmolekularen Aggregate einen Response, auch wenn sie nur in kleinen Konzentrationen vorliegen.

Die Überlagerungen der Kalibrierkurven von Proben mit unterschiedlichem DS aber vergleichbaren Molmassen sind in Abb. 18 dargestellt. Die Proben Avicel 1 und Avicel 2 wurden dabei wegen ihres ungewöhnlichen Verhaltens nicht berücksichtigt.

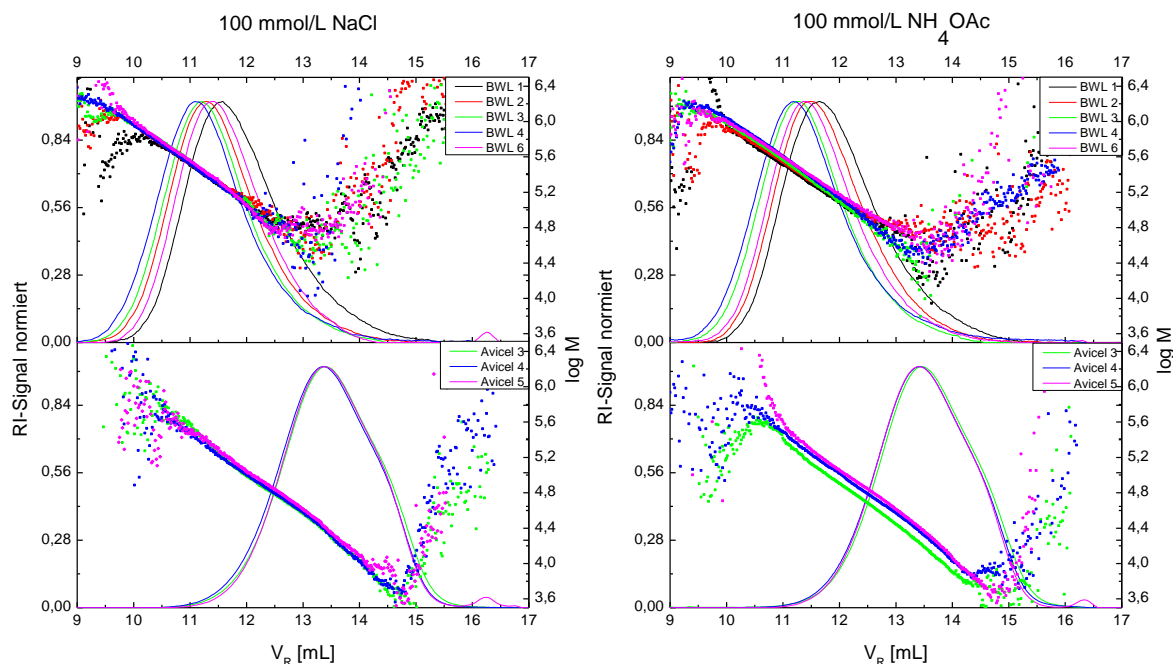


Abb. 18: Überlagerungen der SEC-Kalibrierkurven und SEC-Chromatogramme von NaCMCn mit unterschiedlichem DS aber vergleichbaren Molmassen in 100 mmol/L wässriger NaCl- (links) und 100 mmol/L wässriger NH<sub>4</sub>OAc-Lösung (rechts). BWL 1 – schwarz, BWL 2 – rot, BWL 3, Avicel 3 – grün, BWL 4, Avicel 4 – blau, BWL 6, Avicel 5 – violett.

Die Kalibrierkurven von Proben mit unterschiedlichen DS-Werten stimmen gut miteinander überein. Die relativen Abweichungen der Molmassen bei einem Elutionsvolumen liegen mit ca. 10 % im Rahmen der Messungenauigkeit der MALLS-Methode. Da keine systematische Abhängigkeit des bei einem Elutionsvolumen vorliegenden Molekulargewichtes mit DS besteht, kann angenommen werden, dass die Kalibrierkurven der NaCMCn unabhängig von DS sind. Folglich können Proben mit DS im Bereich 0.45 – 1.55 unabhängig von ihrem DS mit der gleichen Kalibrierkurve ausgewertet werden.



### Skalierungsverhalten der NaCMCn

Um die Struktur der Proben in Lösung zu bestimmen wurde das Skalierungsverhalten des Trägheitsradius  $\langle s^2 \rangle^{1/2}$  bezüglich des Molekulargewichtes untersucht. Dies wurde nur für die BWL-Proben durchgeführt, da für die Avicel-Proben aufgrund ihrer geringen Molmassen und die damit verbundenen geringen Molekülgrößen keine Trägheitsradien bestimmt werden konnten.

In Abb. 19 ist der Trägheitsradius als Funktion des Molekulargewichtes in einer doppeltlogarithmischen Auftragung für die 100 mmol/L wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung als Eluenten dargestellt.

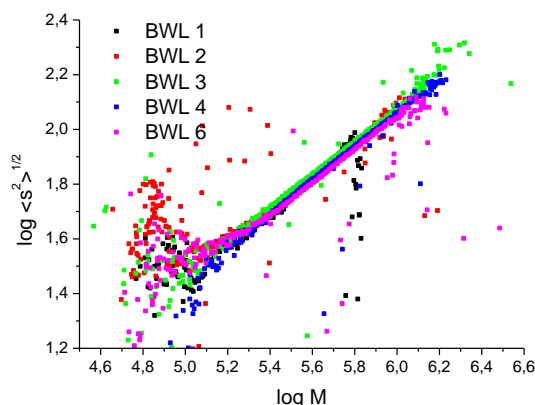


Abb. 19: Überlagerung der Abhängigkeiten  $\log \langle s^2 \rangle^{1/2}$  von  $\log M$  für BWLs in 100 mmol/L wässriger  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung.

In Abb. 19 resultieren nahezu linearen Abhängigkeiten. Die Streuung der Radien an den beiden Enden ist die Konsequenz der Ungenauigkeiten in den Molmassen und Radien, was wiederum auf die unterschiedlichen Empfindlichkeiten des Lichtstreu- und RI-Detektors zurückgeführt werden kann. Die Abhängigkeiten für Proben mit unterschiedlichen DS-Werten sind nahezu deckungsgleich, was auf einen DS-unabhängigen Skalierungsexponenten  $a_s$ , der als Steigung dieser Abhängigkeiten erhalten wird, und somit auf eine DS-unabhängige Struktur der NaCMCn in Lösung hindeutet.

Die aus den Abhängigkeiten bestimmten Skalierungsexponenten  $a_s$  als Steigungen der entsprechenden Regressionsgeraden sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5: Skalierungsexponenten  $a_s$  für BWLs in 100 mmol/L wässriger NaCl- und  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung.

Probe	$a_s$ in NaCl	$a_s$ in $\text{NH}_4\text{OAc}$
BWL 1	$0.62 \pm 0.00$	$0.62 \pm 0.03$
BWL 2	$0.60 \pm 0.01$	$0.60 \pm 0.01$
BWL 3	$0.60 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.01$
BWL 4	$0.61 \pm 0.00$	$0.62 \pm 0.00$
BWL 6	$0.64 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.00$

Für die beiden Eluenten und alle Proben fallen die  $a_s$ -Werte in den Bereich zwischen 0.59 und 0.64, was auf die Struktur eines gut gequollenen Knäuels in beiden Eluenten hindeutet. Vergleicht man die Werte mit Literaturdaten, stellt man fest, dass sie etwas höher liegen als die Werte, die von Kath et al. [22] in 100 mmol/L wässriger KOH- und  $\text{NaNO}_3$ -Lösung bestimmt wurden:  $a_s = 0.54 - 0.58$ , wobei der Grund nicht eindeutig erklärt werden kann.

Die Unterschiede zwischen den beiden Salzen sind auch nicht signifikant und/oder systematisch. Deswegen kann man schlussfolgern, dass im untersuchten Bereich weder DS noch der Salztyp die Lösungsstruktur der NaCMCn beeinflussen. Brown et al. [92] bzw. Rinaudo et al. [21] konnten jeweils für den DS-Bereich 0.21 – 0.94 in Cadoxen (Triethylendiamin-Cadmium Hydroxid) bzw. für den DS-Bereich 1.00 – 2.90 in 100 mmol/L wässriger  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung einen nur sehr leichten Einfluss des DS-Wertes auf die Mark-Houwink-Koeffizienten feststellen, was auch auf eine nahezu DS-unabhängige Lösungsstruktur von NaCMC in den in diesen Arbeiten verwendeten Eluenten hindeutet.

#### *Korrekturfaktoren zur Umrechnung einer pullulanbasierten Kalibrierkurve*

Eine konventionelle SEC-Kalibration ist für NaCMCn nicht möglich, da geeignete Kalibrierstandards fehlen. Auch eine Berechnung der Kalibrierkurve auf Basis der universellen Kalibration war für den vorgesehenen Eluenten (100 mmol/L wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung) nicht möglich, da die notwendigen Mark-Houwink-Koeffizienten nicht bekannt waren.

Die Verwendung einer MALLS-Detektion zur absoluten Molmassenbestimmung ist ein sehr nützliches Tool zur Bestimmung der Molmassen. Sie ist jedoch aufwendig und kann

deswegen nicht immer für eine Routineanalyse eingesetzt werden. Insbesondere für die SEC-Kalibration der 2D chromatographischen Kopplung ist der Einsatz des MALLS-Detektors nahezu unmöglich, da die geringen Konzentrationen nach der zweiten Trenndimension (SEC) nicht ausreichen um hinreichend intensive MALLS-Signale zu erhalten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kalibrationsmethode entwickelt um eine auf kommerziellen Pullulanstandards basierte Kalibrierkurve in eine für NaCMCn geeignete Kalibrierkurve umzurechnen.

Um zu veranschaulichen, dass Pullulane selbst nicht als Kalibrierstandards für NaCMCn geeignet sind, wurden die Molmassen der NaCMCn in beiden Eluenten unter Verwendung einer Pullulankalibrierkurve bestimmt ( $M_{w,pull}$ ) und mit den durch Lichtstreuung ermittelten wahren Molekulargewichten verglichen (siehe Tab. 6). Die Proben Avicel 1 und Avicel 2 wurden wegen ihres ungewöhnlichen Verhaltens nicht ausgewertet.

Tab. 6: Vergleich der auf einer kommerziellen Pullulankalibrierkurve bestimmten  $M_{w,pull}$  der NaCMCn in 100 mmol/L wässriger NaCl- sowie  $NH_4OAc$ -Lösung mit den Referenz- $M_w$  aus Tab. 4.

Probe (DS)	Referenz- $M_w$ aus Tab. 4 [g/mol]	$M_{w,pull}$ in NaCl [g/mol]	$M_{w,pull}$ in $NH_4OAc$ [g/mol]
Avicel 3 (0.98)	39 000	164 000	159 000
Avicel 4 (1.23)	42 000	178 000	171 000
Avicel 5 (1.54)	46 000	162 000	164 000
BWL 1 (0.46)	236 000	967 000	936 000
BWL 2 (0.73)	341 000	1 390 000	1 160 000
BWL 3 (0.95)	386 000	1 570 000	159 000
BWL 4 (1.25)	481 000	1 770 000	1 730 000
BWL 6 (1.55)	318 000	1 220 000	1 320 000

Die durch die Pullulakalibrierung erhaltenene Molmassen weichen für die beiden Eluenten um etwa einen Faktor 4 ab, was die großen Unterschiede der hydrodynamischen Volumen zwischen Pullulan und NaCMC verdeutlicht. Pullulane sind somit für die Molmassenbestimmung der NaCMCn gänzlich ungeeignet.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht mittels der Methode der breiten Kalibration (siehe Kapitel 3.1) geeignete Korrekturfaktoren A und B zu bestimmen, mit deren

Hilfe die pullulanbasierten Kalibrierkurve in eine für NaCMCn geeignete umgerechnet werden kann.

Um die Korrekturfaktoren A und B in dieser Arbeit zu bestimmen, wurden für die beiden Eluenten die SEC-Chromatogramme und  $M_{w,s}$  der Proben Avicel 3-5 und aller BWL-Proben in Verbindung mit der pullulanbasierten Grundkalibration verwendet. Mithilfe des im theoretischen Teil beschriebenen Verfahrens wurden die folgenden Korrekturfaktoren für NaCMCn in wässriger NaCl- bzw.  $NH_4OAc$ -Lösung bestimmt:

NaCl:            A: 0.22            B: 1.01

$NH_4OAc$ :       A: 0.21            B: 1.01

Mit diesen Korrekturfaktoren und Gleichung 11 wurde die NaCMC-Kalibrierkurve berechnet, die anschließend zur Bestimmung der gewichtsmittleren Molmassen der NaCMCn verwendet wurde. Diese als  $M_{w,rück}$  bezeichneten Werte sind für die beiden Eluenten in Tab. 7 angegeben.

Tab. 7: Vergleich der auf Basis der Korrekturfaktoren erhaltenen gewichtsmittleren Molekulargewichte ( $M_{w,rück}$ ) der NaCMCn in 100 mmol/L wässriger NaCl- sowie  $NH_4OAc$ -Lösung mit den durch Lichtstreuung bestimmten Referenz- $M_w$ .

Probe (DS)	Referenz- $M_w$ aus Tab. 4 [g/mol]	$M_{w,rück}$ in NaCl [g/mol]	$M_{w,rück}$ in $NH_4OAc$ [g/mol]
Avicel 3 (0.98)	39 000	40 000	37 000
Avicel 4 (1.23)	42 000	44 000	40 000
Avicel 5 (1.54)	46 000	40 000	38 000
BWL 1 (0.46)	236 000	244 000	228 000
BWL 2 (0.73)	341 000	351 000	280 000
BWL 3 (0.95)	386 000	398 000	375 000
BWL 4 (1.25)	481 000	450 000	419 000
BWL 6 (1.55)	318 000	309 000	311 000

Die mittleren Abweichungen der zurückgerechneten  $M_w$ -Werte ( $M_{w,rück}$ ) von den Referenzwerten (Referenz- $M_w$ ) belaufen sich auf ca. 6 % für NaCl und 10 % für  $NH_4OAc$  und liegen somit im Rahmen der Fehler für Lichtstremessungen. Somit können die

bestimmten Korrekturfaktoren zur Umrechnung einer pullulanbasierten Kalibration in eine für NaCMCn geeignete Kalibration verwendet werden. Hierdurch ist es möglich die korrekten Molmassen der NaCMCn zuverlässig zu bestimmen ohne dass der aufwendige Einsatz eines MALLS-Detektors notwendig werden wird.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel eine verlässliche Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von NaCMC mit DS-Werten im Bereich 0.45 – 1.55 entwickelt, die den Anforderungen an eine online 2D chromatographische Trennung unter Verwendung des ELS-Detektors entspricht. Die SEC-Kalibrierkurven zeigen keine DS-Abhängigkeit, woraus die Möglichkeit resultiert, NaCMCn unterschiedlicher DS-Werte mit ein und derselben Kalibrierkurve auszuwerten. Es wurden Korrekturfaktoren ermittelt, die es erlauben eine auf Pullulan basierte Kalibrierkurve in eine für NaCMC geeignete SEC-Kalibrationskurve umzurechnen. Hieraus resultiert die Möglichkeit basierend auf kommerziellen Standards korrekte Molekulargewichte zu ermitteln. Das Skalierungsverhalten des Trägheitsradius belegt, dass NaCMCn in den verwendeten Eluenten die Struktur eines ausgedehnten Knäuels aufweisen, welche nicht durch DS beeinflusst wird. Während der Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Proben Avicel 1, Avicel 2 und BWL 2 ein von den anderen Proben abweichendes Verhalten zeigen, was auf ihr Aggregationsverhalten zurückgeführt wurde. Außerdem ist zu vermuten, dass die gegenüber den anderen BWL-Proben geringere mittlere Molmasse von BWL 6 durch die zweistufige Synthese bedingt ist.

Nachdem somit die Voraussetzungen für eine korrekte Molekulargewichtsbestimmung unter den Anforderungen der 2D-Chromatographie geschaffen waren, sollte eine Methode entwickelt werden, die eine Trennung aufgrund der chemischen Zusammensetzung erlaubt. Eine derartige Methode würde die Charakterisierung der chemischen Heterogenität von NaCMCn gestatten.

#### **4.2 Trennung von NaCMCn nach der chemischen Zusammensetzung (DS)**

In diesem Kapitel wird zunächst die Entwicklung einer Gradientenmethode beschrieben, die eine Trennung unterschiedlich stark substituierter NaCMC-Ketten nach ihrer chemischen Zusammensetzung (DS) erlaubt. Mit dieser Methode sollen anschließend die DS-Verteilungen innerhalb individueller Proben berechnet, und so Informationen über die chemische Heterogenität 1. Ordnung in NaCMCn erhalten werden.

Zunächst erfolgte ein Screening von stationären und mobilen Phasen, da zur Trennung von NaCMCn nach dem Substitutionsgrad bislang keine Informationen in der Literatur zu finden waren.

#### *Auswahl geeigneter stationärer und mobiler Phasen*

Um eine geeignete mobile Phase zu bestimmen wurde zunächst untersucht inwieweit wässrige NaCMC-Lösungen mit organischen Lösungsmitteln (Modifiern) versetzt werden können ohne dass es dabei zum Ausfallen des Probenmaterials kommt. Der Grund dafür ist, dass in der Gradientenchromatographie während des chromatographischen Prozesses die Eluentenzusammensetzung so verändert wird, dass im Idealfall zunächst die Probe in einem schwachen Eluenten auf die stationäre Phase gebracht und adsorbiert wird. Durch die Erhöhung des Anteils des starken Eluenten wird die Desorption der Probe erreicht, wodurch die Probe von der Säule eluiert werden kann. Bei wasserlöslichen Substanzen kann Wasser als eine Komponente des Eluentensystems verwendet werden. Die Eluentenstärke wird durch die Zugabe eines organischen Lösungsmittels/Modifiers verändert. Damit es während des ganzen Prozesses nicht zum Ausfallen des Probenmaterials auf der Säule kommt, sollte wünschenswerterweise der organische Modifier auch ein gutes Lösungsmittel für den Analyten sein. Zumindest sollte jedoch über einen großen Zusammensetzungsbereich der Eluentenmischung noch die Löslichkeit des Analyten gewährleistet sein. Zur Bestimmung der Löslichkeitsgrenzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die rein wässrigen bzw.  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -enthaltenen (100 mmol/L) wässrigen NaCMC-Lösungen schrittweise bis zur Trübung mit Aceton, Isopropanol, THF, Ethanol, Methanol versetzt. Tab. 8 gibt die experimentell ermittelten Trübungsgrenzen an.

Tab. 8 zeigt, dass bis zur Trübung umso mehr eines organischen Modifiers zugesetzt werden kann, je höher dessen Polarität ist. Der Zusatz von  $\text{NH}_4\text{OAc}$  führt zu einer Verschiebung der Trübungsgrenzen zu niedrigeren Anteilen des organischen Modifiers. Offensichtlich verringert der Zusatz von  $\text{NH}_4\text{OAc}$  die Lösungsmittelqualität von Wasser für NaCMCn. Gemäß Tab. 8 gewährleistet Methanol über den größten Zusammensetzungsbereich die Löslichkeit der NaCMC. Daher wurde es in der Gradientenchromatographie als organischer Modifier überwiegend verwendet.

Tab. 8: Ermittelte Fällungsgrenzen/Trübungsgrenzen organischer Modifier [Vol %] für NaCMC (Probe 1, siehe Tab. 15) gelöst im Wasser oder wässriger 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung bei 20 g/L.

Organischer Modifier	Anteil des organischen Modifiers bei Fällung/Trübung [Vol %]	
	Probe gelöst im Wasser	Probe gelöst in wässriger 100 mmol/L $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung
Aceton	30	25
Isopropanol	55	47-50
THF	58-60	50
Ethanol	60-63	55-60
Methanol	> 90	75

Zur Auswahl einer geeigneten stationären Phase wurden einige Normalphasen sowie Umkehrphasen getestet. Dabei wurden bei Normalphasen lineare Gradienten von einem großen Anteil des organischen Modifiers (hauptsächlich Methanol) nach reinem Wasser durchgeführt. Bei allen Versuchen konnte entweder keine oder keine ausreichende Adsorption der NaCMCn erzielt werden. Dies zeigte sich daran, dass entweder die ganze Probe oder ein Großteil vor dem Totvolumen der Säule eluierte. Offenbar verhindert der Wassergehalt, der zur Erhaltung der Löslichkeit der NaCMCn erforderlich ist, die Adsorption auf Normalphasen. Bei Umkehrphasen wurden dagegen lineare Gradienten von Wasser nach Methanol oder anderen organischen Modifier durchgeführt, um zu Beginn des Gradienten unpolare Wechselwirkungen zwischen den NaCMCn und der stationären Phase zu erzielen. Auch in diesem Fall eluierten die Proben bei nahezu allen Versuchen vor dem Totvolumen der Säule, woraus geschlossen werden konnte, dass aus reinem Wasser keine Adsorption von NaCMC an Umkehrphasen erreicht werden kann. Dies lässt sich durch den Mangel an hydrophoben organischen Gruppen in NaCMC erklären.

Da weder auf Normal- noch auf Umkehrphasen eine hinreichende Adsorption erzielt werden konnte, wurde nach alternativen Phasen gesucht, die für sehr polare Substanzen wie NaCMCn geeignet sind und stärkere bzw. zusätzliche Wechselwirkungen dieser Stoffe mit aktiven Zentren erlauben.

In jüngster Zeit wird zunehmend die hydrophile Wechselwirkungschromatographie (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) zur Trennung stark polarer

Substanzen verwendet [93, 94]. Jedoch liegen bislang kaum Informationen zur Anwendung von HILIC im Polymerbereich vor.

Allgemein kann die HILIC als eine Verteilungschromatographie betrachtet werden. In der Nähe der Oberfläche der polaren stationären Phase bildet sich eine wasserreiche Schicht. Die mobile Phase kann als wasserarm betrachtet werden, da sie einen großen Anteil eines organischen Modifiers (Acetonitrils, THFs, Methanols oder anderen) enthält. Der hydrophile polare Analyt verteilt sich zwischen der mobilen Phase und der wasserreichen Schicht der stationären Phase. Je hydrophiler bzw. je polarer der Analyt ist, desto größere Affinität besitzt dieser zur wasserreichen Schicht und desto stärker wird dieser retardiert. Mit anderen Worten basiert die Trennung auf der Polarität der Verbindungen sowie auf ihrem Solvatisierungsgrad. Dabei treten zwischen dem Analyt und der wasserreichen Schicht der stationären Phase Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen auf. Bei HILIC-Phasen, die ionische funktionelle Gruppen enthalten, zu denen auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete zwitterionische HILIC-Phase hinzugehört, können zusätzlich noch elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HILIC-Phase, die aus einer polymerbasierten Matrix mit darauf chemisch gebundenen zwitterionischen funktionellen Gruppen (siehe Abb. 20) besteht, verwendet.

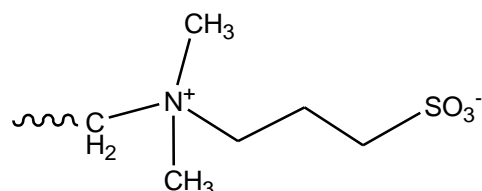


Abb. 20: Funktionelle Gruppe in der verwendeten im Rahmen dieser Arbeit HILIC stationären Phase.

HILIC ist komplementär zur Umkehrphasen(RP)chromatographie, da die beiden inverse Elutionsreihenfolgen zeigen. Dabei stimmt die Elutionsordnung der HILIC oft mit der Normalphasen(NP)chromatographie überein. Im Gegensatz zur NP-Chromatographie sind die mobilen Phasen der HILIC jedoch den mobilen Phasen der RP-Chromatographie sehr ähnlich. Das ist ein deutlicher Vorteil der HILIC gegenüber der NP-Chromatographie, da die Löslichkeit sehr polarer Substanzen in diesen wasserhaltigen mobilen Phasen deutlich besser ist. HILIC kann auch als Gradientelution verwendet werden, allerdings wird im Laufe des Experimentes die Polarität des Eluenten erhöht. Der Gradient wird mit einem wenig polaren Eluenten mit einem hohen Anteil des organischen Modifiers gestartet, dessen Anteil im Laufe



des Gradienten gesenkt wird. Verglichen mit der RP-Chromatographie wird somit eine inverse Gradientenrichtung verwendet. Bei der HILIC darf der Gradient jedoch nie mit 100 % des organischen Modifiers gestartet werden, da zur Ausbildung der oberflächennahen wasserreichen Schicht auf der stationären Phase ein minimaler Wasseranteil von etwa 5 % zwingend erforderlich ist.

Um zu überprüfen ob sich die HILIC zur Untersuchung der chemischen Heterogenität der NaCMCn eignet, wurden Gradientenexperimente durchgeführt. Dabei wurden der Typ des organischen Modifiers, die Gradientendauer, die Säulentemperatur, die Flussrate und die Konzentration des Ammoniumacetats im Eluenten verändert. Alle Gradienten wurden immer von einem weniger polaren Eluenten, d.h. von einem hohen Anteil des organischen Modifiers, zu einem Eluenten höherer Polarität, d.h. mit einem höheren Wasseranteil, durchgeführt, wie es für HILIC-Anwendungen typisch ist. Die Chromatogramme von NaCMCn unterschiedlicher DS-Werte in den beiden erfolgversprechendsten Gradienten, sind in Abb. 21 dargestellt.

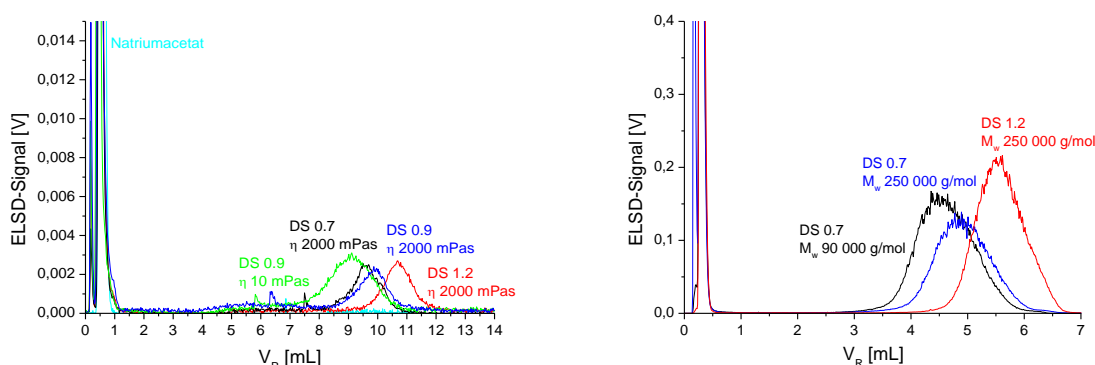


Abb. 21: Chromatographische Trennungen von NaCMCn-Proben auf der SeQuant ZIC-pHILIC Phase. Links: 40 min linearer Gradient von Methanol/Wasser (100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) = 90/10 nach 0/100, Rad 79 (schwarz), Rad 62 (blau), Rad 80 (rot), Rad 78 (grün), Natriumacetat (hellblau) gelöst im Wasser (100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Rechts: 25 min linearer Gradient von THF/Wasser (150 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) = 60/40 nach 0/100, Probe 1 (schwarz), Probe 2 (blau), Probe 3 (rot) gelöst in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  = 60/40.

In der linken Graphik können in den Chromatogrammen aller Proben Peaks um 0.2 mL, um 0.5 mL und im Elutionsbereich ab 7 mL detektiert werden. Beim Peak um 0.2 mL handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen Breakthroughpeak. Dieser kommt dadurch zustande, dass das Lösungsmittel der Proben gleichzeitig ein starker Eluent ist und nicht mit dem Eluenten zu Beginn des Gradienten, welcher ein schwacher Eluent ist, übereinstimmt. Somit kann ein Teil der Probe im injizierten Lösungsmittelfropfen durch die Säule wandern ohne dass es zu

hinreichenden Wechselwirkungen mit der stationären Phase kommt. Diese Probenbestandteile eluieren nahe am Totvolumen der Säule, also noch bevor der eigentliche Gradient einsetzt. Der Peak um 0.5 mL wird eventuell durch Natriumacetat verursacht, welches durch den Austausch der Ammoniumkationen gegen Natriumkationen der NaCMCn entsteht (für eine ausführliche Erklärung siehe unten). Die Vermutung, dass dieser Peak durch Natriumacetat verursacht wird, wird dadurch gestützt, dass die Injektion des reinen Natriumacetates ebenfalls bei genau diesem Elutionsvolumen zu einem Peak führt. Die Peaks im Elutionsbereich ab ca. 7 mL eluieren im Gradienten und sind den NaCMCn zuzuordnen. Beim Vergleich der Peaklagen der unterschiedlichen Proben erkennt man, dass Proben unterschiedlicher DS und gleicher Viskositäten (bzw. Molmassen) bei unterschiedlichen Elutionsvolumen eluieren. Somit findet bei gleichem Molekulargewicht eine Trennung nach DS statt, wobei die höher substituierten Proben später eluieren. Dies kann damit erklärt werden, dass Proben mit höheren Anteilen der polaren Carboxymethyl(CM)-Substituenten hydrophiler sind und stärker mit der wasserreichen oberflächennahen Schicht auf der stationären Phase wechselwirken. Allerdings unterscheiden sich auch die Retentionszeiten der Proben mit gleichen DS-Werten aber unterschiedlichen Viskositäten (bzw. Molmassen). Dabei eluieren Proben mit höheren Viskositäten bzw. Molmassen später. Das kann durch den Einfluss der Kettenlänge auf die Retention erklärt werden. Wie im theoretischen Teil beschrieben ist, enthalten längere Ketten höhere Anteile der funktionellen Gruppen verglichen mit kürzeren Ketten gleicher chemischen Zusammensetzung und werden deswegen stärker retardiert. Dies gilt im Gradienten allerdings nur für relativ kurze Ketten. Für längere Ketten verschwindet die Kettenlängen- (Molekulargewichts)abhängigkeit, da diese Ketten im Gradienten bei den Eluentenzusammensetzungen, die gut mit kritischen Eluentenzusammensetzungen übereinstimmen, eluieren.

In der rechten Graphik können in den Chromatogrammen aller Proben Peaks um 0.3 mL und im Elutionsbereich ab 3 mL detektiert werden. Da das Lösungsmittel der Proben mit dem Eluenten zu Beginn des Gradienten übereinstimmt, ist das Auftreten des Breakthroughpeaks in diesem Fall eher unwahrscheinlich. Der Peak um 0.3 mL resultiert wahrscheinlich von Natriumacetat. Die Peaks im Elutionsbereich ab 3 mL eluieren im Gradienten und sind den NaCMCn zuzuordnen. Die Proben unterschiedlicher DS und gleicher Molmassen eluieren bei unterschiedlichen Elutionsvolumen, was auf eine DS-abhängige Trennung hinweist. Auch

hier unterscheiden sich die Retentionszeiten der Proben mit gleichen DS-Werten aber unterschiedlichen Molmassen, wobei erneut Proben mit höheren Molmassen später eluieren.

Zwar resultiert in beiden Gradienten der Abb. 21 eine DS-abhängige Elution der NaCMCn, wobei die Kettenlänge noch einen leichten Einfluss auf die Trennung ausübt, trotzdem wurden diese Trennungen nicht weiter optimiert und untersucht. Der Grund dafür war eine relativ niedrige Wiederfindung der NaCMCn unter den verwendeten experimentellen Bedingungen. So wurde für Rad 62 bei isokratischer Elution in 150 mmol/L wässriger  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung (also in einem guten Eluenten in den beiden obigen Gradienten) nur eine Wiederfindung von ca. 55 % bestimmt. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung einer chromatographischen Methode zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität von NaCMCn auf einer anderen stationären Phase weitergeführt.

Sehr polare Substanzen, die an Heteroatome wie Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel gebundene Wasserstoffatome enthalten, können effizient auf stationären Phasen getrennt werden, die Wasserstoffbrückenbindungen mit den Analytmolekülen erlauben. Eine solche stationäre Phase bildet ein mit Pentafluorophenylpropyl-(PFP)-Liganden (siehe Abb. 22) modifiziertes Silicagel.

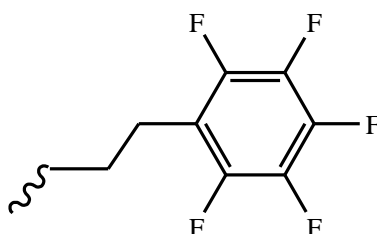


Abb. 22: Funktionelle Gruppe in der verwendeten in der vorliegenden Arbeit stationären Phase, die zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen mit Analytmolekülen befähigt ist.

Dabei können elektronenpositive Wasserstoffatome, die kovalent an Sauerstoff gebunden sind, mit den elektronegativen Fluoratomen der PFP-Liganden elektrostatisch wechselwirken. Zusätzlich kann die Möglichkeit zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen erhöht werden indem mobile Phasen mit kleinen pH-Werten verwendet werden, da diese dazu neigen Basen zu protonieren. Natürlich sind auch andere Typen der Wechselwirkungen (wie z.B. Dipol-Dipol-,  $\pi$ - $\pi$ - oder hydrophobe Wechselwirkungen) bei Verwendung dieser stationären Phasen potentiell vorhanden und können zur Retention beitragen.

NaCMCn besitzen zum einen die unsubstituierten Hydroxylgruppen und zum anderen die CM-Substituenten, wobei die zweiten im sauren Milieu teilweise in saurer Form vorliegen. Beide funktionellen Gruppen sind somit potentiell zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den PFP-Liganden geeignet. Daher wurde die Eignung der genannten stationären Phase zur Trennung der NaCMCn nach DS untersucht.

Im Gegensatz zu den vorher diskutierten HILIC-Phasen weisen die PFP-Liganden auch die RP-Eigenschaften auf. Daher kann der Gradient auch mit einem polaren Eluenten gestartet werden, wobei dessen Polarität während des chromatographischen Experimentes durch Zugabe des organischen Modifiers gesenkt wird. Diese Gradientenführung ist damit genau umgekehrt zur HILIC.

Zur Entwicklung einer Trennmethode auf der PFP-modifizierten Phase wurde Methanol als organischer Modifier eingesetzt, da es von den geprüften organischen Modifiern die beste Löslichkeit der NaCMCn gewährleistet (siehe Tab. 8).

Zunächst wurde ein 10 minütiger linearer Gradient von Wasser/Methanol = 95/5 nach 0/100 für die Trennung der ausgewählten Avicel- und BWL-Proben angewandt. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 23 dargestellt.

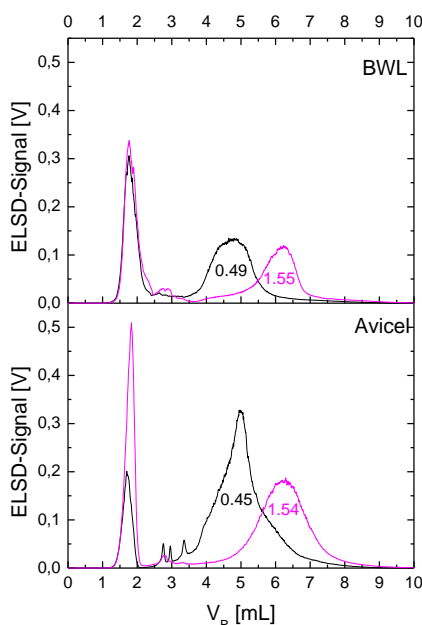


Abb. 23: Überlagerungen der Chromatogramme der BWLs (oben) und Avicels (unten) (BWL 1, Avicel 1 – schwarz und BWL 6, Avicel 5 – violett) auf der Luna PFP (2) Säule unter Verwendung eines 10 min linearen Gradienten von Wasser/Methanol = 95/5 nach 0/100 ohne Puffer. Injektionsvolumen 100  $\mu$ L. DS-Werte sind neben den Kurven angegeben.

In jedem Chromatogramm werden jeweils zwei Peaks detektiert, einer bei ca. 1.8 mL und der andere im Elutionsbereich zwischen 3 und 8 mL. Das durch Injektion von reinem Natriumacetat bestimmte Totvolumen beläuft sich auf ca. 3 mL. Dadurch ist offensichtlich, dass der Peak bei 1.8 mL durch höhermolekulare Probenbestandteile, z.B. durch nicht adsorbiertes aber ausgeschlossenes Polymermaterial verursacht wird. Daraus folgt, dass die Proben nicht vollständig, sondern nur partiell am Anfang des Gradienten adsorbieren. Durch die Erhöhung des Anteils des starken Eluenten während des chromatographischen Laufs wird der adsorbierte Probenanteil desorbiert und kann von der Säule eluieren, woraus die Peaks zwischen 3 und 8 mL in den Chromatogrammen resultieren. Trotz der nur unvollständigen Adsorption wird jedoch klar, dass für die beiden Probenreihen die Proben mit höheren DS-Werten später eluieren als die Proben mit kleineren DS-Werten. Dies kann als erster Hinweis darauf gewertet werden, dass eine DS-abhängige Elution auf der gewählten stationären Phase möglich ist.

Es ist nicht möglich das in Abb. 23 beobachtete chromatographische Verhalten rein auf der Polarität basierend zu erklären, da die CM-Gruppen sehr polare Substituenten sind. Somit sollten Proben mit hohen DS-Werten früher, also bei einem höheren Wassergehalt im Eluenten, eluieren als Proben mit geringeren DS-Werten. Dies konnte allerdings experimentell nicht bestätigt werden. Die folgenden Effekte könnten die erhaltenen Ergebnisse erklären. Zum einen könnte die Konformation der Polymerketten die Trennung beeinflussen. Ohne Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkungen ist zu erwarten, dass die substituierten Ketten wegen der Abstoßung der gleichgeladenen CM-Substituenten gestreckt sind. Dieser Effekt sollte bei den Ketten mit höheren DS-Werten stärker ausgeprägt sein als bei den weniger stark substituierten Ketten. Aufgrund der stärker gestreckten Konformation könnten die höher substituierten Ketten für die Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial besser zugänglich sein, als die weniger substituierten Ketten. Folglich sollten die höher substituierten Ketten stärker adsorbieren und somit später die stationäre Phase verlassen. Des Weiteren könnten die Na-CM-Substituenten in der wässrigen mobilen Phase protoniert werden und damit in die korrespondierenden Säuren überführt werden. Diese können mit PFP-Liganden der stationären Phase via Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Die Anzahl derartiger Wechselwirkungen steigt mit DS an, woraus eine stärkere Retention der höher substituierten Proben resultiert.

Wenn die Elutionsvolumen der niedermolekularen Avicels und hochmolekularen BWLs ähnlicher DS-Werte miteinander verglichen werden, stellt man fest, dass die Kettenlänge die Retention bei den gegebenen chromatographischen Bedingungen nur geringfügig beeinflusst. Die Breite der Elutionspeaks zwischen 3 und 8 mL wird somit wohl hauptsächlich durch die chemische Heterogenität der Proben hervorgerufen. Dies wiederum bedeutet, dass innerhalb der unterschiedlichen Proben Ketten mit deutlich unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen (DS-Werten) existieren, also eine ausgeprägte chemische Heterogenität 1. Ordnung vorliegt.

#### *Optimierung der Trennung durch Variation des pH-Wertes*

Um zu überprüfen, ob durch eine Veränderung des pH-Wertes die Adsorptionsstärke der Proben auf der stationären Phase verändert und somit eine verbesserte Auflösung erzielt werden kann, wurden pH-Werte im Bereich zwischen 3.46 und 6.06 mit Essigsäure unter Verwendung von 100 mmol/L verdampfbarem Ammoniumacetates eingestellt. Die Verwendung des flüchtigen Puffers war erforderlich, da zur Detektion ein ELSD verwendet wurde, welcher seinerseits aufgrund der Gradientenelution eingesetzt wurde. Das Defizit an geeigneten Chromophoren in den NaCMCn verhindert die Verwendung eines UV-Detektors. Der Einsatz eines RI-Detektors in einem Gradientenexperiment ist ebenfalls nicht möglich. Die Pufferkonzentration von 100 mmol/L wurde verwendet um eine potentielle elektrostatische Abstoßung der geladenen Polyanionen abzuschirmen und so eventuelle Einflüsse der Kettenkonformation auf die Retention auszuschließen. pH-Werte kleiner als 3.46 wurden nicht verwendet, da die Löslichkeit von CMCn in saurer Form begrenzt ist. Zudem lassen sich mit Ammoniumacetatpufferlösungen nur pH-Werte im genannten pH-Bereich verlässlich einstellen. Ammoniumacetat und Essigsäure wurden in gleichen Konzentrationen auch dem Methanol zugegeben um die Salz- sowie Säurekonzentration während des Gradientenexperimentes konstant zu halten. Zunächst wurde das Retentionsverhalten der NaCMCn in einem 40 minütigen linearen Gradient von Wasser/Methanol = 95/5 nach 20/80 bei pH-Werten 6.06, 4.76, 4.54, 4.10 und 3.46 untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 24 dargestellt.

In jedem Chromatogramm in Abb. 24 wird ein Peak am Totvolumen der Säule bei ca. 3 mL detektiert, welcher durch das niedermolekulare Natriumacetat verursacht wurde, wie mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (siehe unten). Für den höchsten und den

niedrigsten pH von 6.06 und 3.46 beobachtet man in jeder Probe jeweils einen weiteren Peak nahe dem Ausschlussvolumen der Säule bei ca. 1.8 mL, welcher höchstwahrscheinlich durch nicht adsorbierte und somit ausgeschlossene CMC-Ketten verursacht wird. Im Elutionsbereich ab ca. 4 mL eluieren die ursprünglich adsorbierten und im Verlaufe des Gradientenexperimentes desorbierten CMC-Ketten, was ebenfalls mittels FTIR-Spektroskopie belegt wurde (siehe unten).

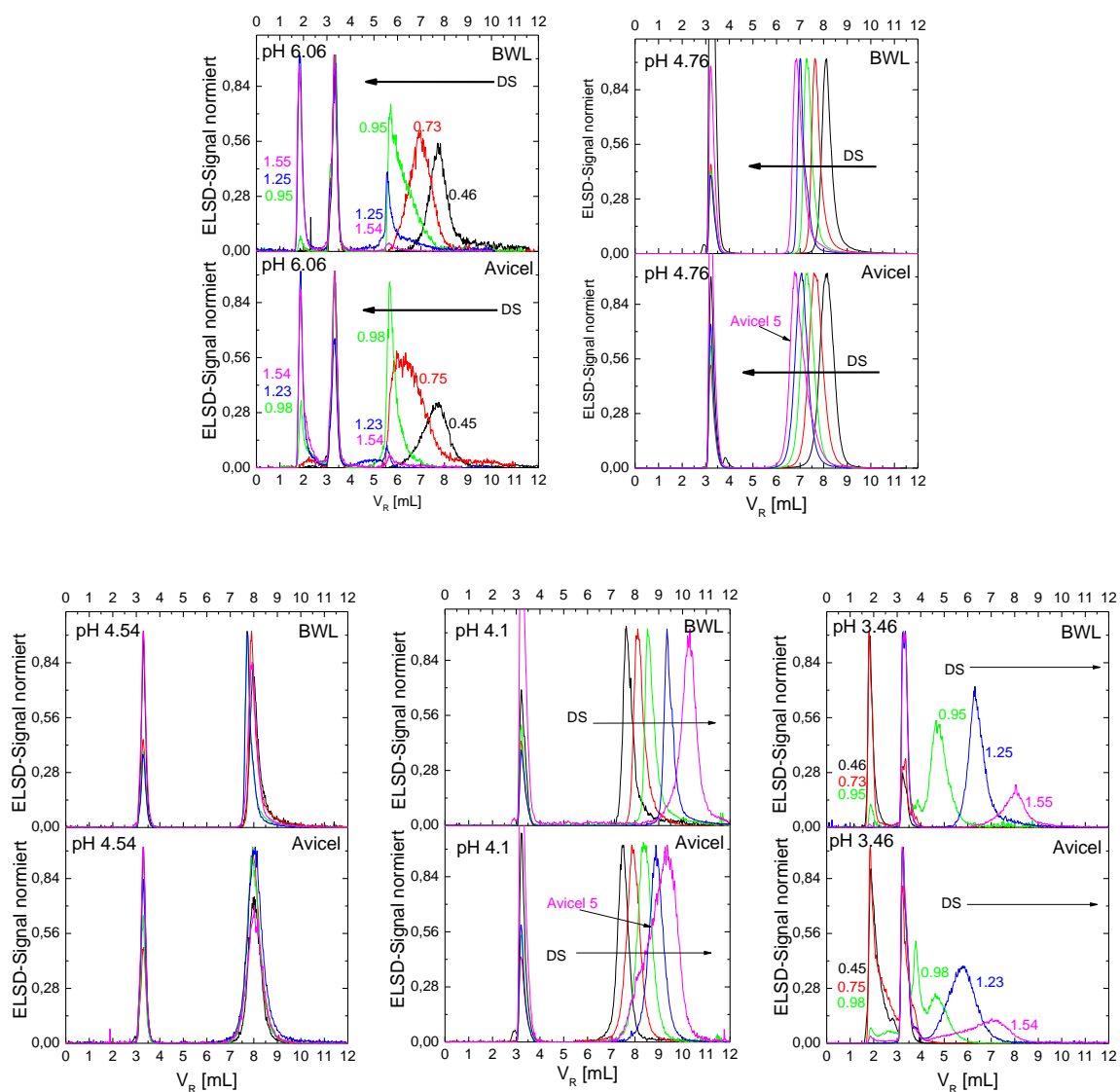


Abb. 24: Überlagerungen der Chromatogramme der BWLs (jeweils oben) und Avicels (jeweils unten), BWL 1 und Avicel 1 (schwarz), BWL 2 und Avicel 2 (rot), BWL 3 und Avicel 3 (grün), BWL 4 und Avicel 4 (blau), BWL 6 und Avicel 5 (violett) erhalten in einem 40 minütigen linearen Gradient von Wasser/Methanol = 95/5 nach 20/80 bei unterschiedlichen pHs (oben: links – 6.06, rechts – 4.76, unten: von links nach rechts: 4.54, 4.10, 3.46). Injektionsvolumen 50  $\mu$ L. DS-Werte sind neben den Kurven angegeben.

Die Identifizierung der Peaks bei 3 mL und im Bereich 7-14 mL wurde exemplarisch an den technischen CMC-Proben durchgeführt. Hierzu wurde eine LC-FTIR-Kopplung unter Verwendung des LC-Transform Interfaces (siehe theoretischer Teil) durchgeführt. Die erhaltenen FTIR-Spektren der chromatographischen Fraktion bei ca. 3 mL und einer der Fraktionen im Elutionsbereich zwischen 7 und 14 mL sind in Abb. 25 dargestellt.

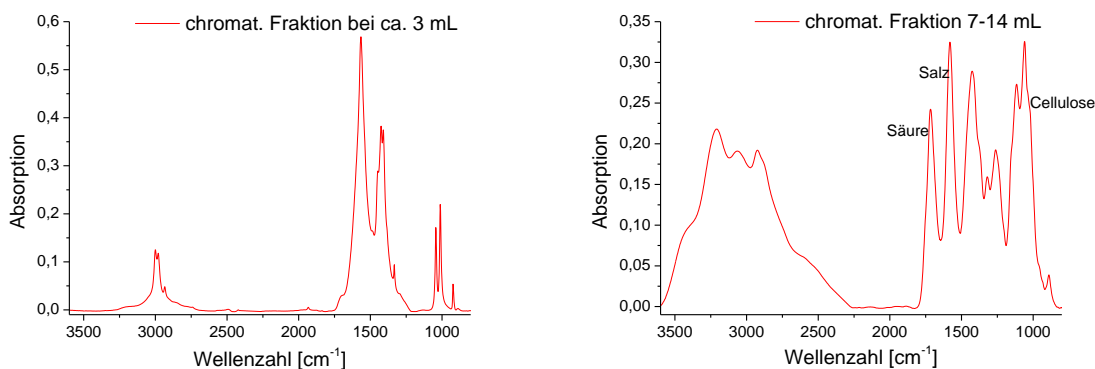


Abb. 25: FTIR-Spektren der Fraktionen der Gradientenchromatographie für Probe Rad 80 bei pH = 4.1. Links: FTIR-Spektrum der Fraktion bei ca. 3 mL, rechts: eine der Fraktionen im Elutionsbereich 7 – 14 mL.

In den Spektren der Abb. 25 erkennt man deutliche Unterschiede. Diese belegen, dass die Peaks durch chemisch unterschiedliche Strukturen hervorgerufen wurden. Die Anwesenheit der Absorptionsbande bei  $1059\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum des spät eluierenden Peaks, die typisch für das Celluloserückgrat ist, weist darauf hin, dass die CMCn zwischen 7 – 14 mL eluieren. Hingegen deutet die Abwesenheit dieser Bande im linken Spektrum darauf hin, dass diese Fraktion keine CMC enthält. Durch den Literaturvergleich [95] des linken Spektrums wurde eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Spektrum von Natriumacetat festgestellt, so dass angenommen werden kann, dass dieses höchstwahrscheinlich durch den Austausch der Gegenionen der Polymerkette und des Puffersystems gebildet wird. Die Anwesenheit zweier Carbonylbanden (der Säure bei  $1715\text{ cm}^{-1}$  und des Salzes bei  $1578\text{ cm}^{-1}$ ) im Spektrum der CMC deutet darauf hin, dass die Carboxylatgruppen neben der Salz- auch in ihrer protonierten Form (Säure) vorliegen, worauf näher im Kapitel 4.3.2 eingegangen wird.

Bei der Betrachtung von Abb. 24 ist bemerkenswert, dass die Elutionsreihenfolgen der NaCMCn sich in Abhängigkeit vom pH-Wert umkehren. Während bei pH-Werten  $> 4.54$  die Proben mit kleinen DS-Werten stärker retardiert werden, ist bei  $\text{pH} < 4.54$  das Gegenteil der Fall. Das beobachtete Retentionsverhalten der Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert kann



durch das folgende Modell teilweise erklärt werden. Es wird angenommen, dass in NaCMCn die beiden funktionellen Gruppen – die unsubstituierten Hydroxylgruppen und die CM-Substituenten – mit der stationären Phase über Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Die Stärke der Wechselwirkungen der OH-Gruppen ist dabei pH-unabhängig, während die Wechselwirkungen der CM-Substituenten umso stärker sind je kleiner der pH-Wert der mobilen Phase ist. Bei den CM-Substituenten stehen die Säure- und die Salzform in den verwendeten wässrigen mobilen Phasen miteinander im Gleichgewicht, wobei nur die Säureform zu den Wasserstoffbrückenbindungen mit der stationären Phase fähig ist. Mit dem sinkenden pH-Wert wird das Gleichgewicht auf die Säureseite verschoben, was zu den stärkeren Wechselwirkungen der CM-Substituenten mit der stationären Phase führt.

Nach diesem Modell ist es sehr wahrscheinlich, dass bei  $\text{pH} = 6.06$  die OH-Gruppen die Retention dominieren, da bei diesen experimentellen Bedingungen das Gleichgewicht der CM-Substituenten deutlich auf die Salzseite verschoben ist und somit die Substituenten nicht oder nur schwach zur Retention beitragen. Deswegen eluieren die Proben bei diesem pH in der Reihenfolge sinkender DS-Werte (bzw. steigender Anteile der OH-Gruppen). Offensichtlich ist die Stärke der Wechselwirkungen der OH-Gruppen nicht ausreichend um eine vollständige Retention vor allem hochsubstituierter Proben (mit kleinen Anteilen der OH-Gruppen) zu erreichen, weswegen ein Teil dieser Proben nicht adsorbiert wird und am Ausschlussvolumen der Säule (bei ca. 1.8 mL) eluiert.

Die Senkung des pH-Wertes auf 4.76 führt zu einer vollständigen Retention aller Proben, da offensichtlich durch eine leichte Verschiebung des Protolysegleichgewichtes der CM-Substituenten auf die Säureseite die Stärke der Wechselwirkungen der CM-Substituenten mit der stationären Phase steigt, was dazu führt, dass die bei  $\text{pH} = 6.06$  nicht adsorbierten hochsubstituierten Probenanteile bei  $\text{pH} = 4.76$  adsorbiert werden. Trotz verstärkter Wechselwirkungen der sauren CM-Gruppen, dominiert bei diesem pH-Wert immer noch der Beitrag der OH-Gruppen zur Retention, weswegen die Proben in der Reihenfolge sinkender DS-Werte eluieren.

Eine weitere Senkung des pH-Wertes auf 4.54 führt offensichtlich dazu, dass die Beträge der beiden funktionellen Gruppen zur Retention sich kompensieren, was zu einer vollständigen und DS-unabhängigen Retention der beiden Probensets Avicel und BWL führt.

Bei einer weiteren Senkung des pH-Wertes auf 4.1 liegt das Gleichgewicht der CM-Substituenten deutlich auf der Säureseite, was dazu führt, dass ihr Beitrag zur Retention den Beitrag der Hydroxylgruppen übersteigt. Dies führt seinerseits dazu, dass sich die Elutionsreihenfolge der Proben umkehrt. Die Proben adsorbieren dabei vollständig und eluieren in der Reihenfolge steigender DS-Werte.

Bei einer weiteren Senkung des pH-Wertes auf 3.46 würde man erwarten, dass die Elutionsstärke der Proben entweder weiter ansteigt, wenn das Gleichgewicht der CM-Gruppen noch mehr auf die Säureseite verschoben wird, oder zumindest verglichen mit pH = 4.1 konstant bleibt, wenn schon bereits beim pH = 4.1 das Gleichgewicht vollständig auf der Säureseite liegt. Hierdurch würde sich die Elutionsreihenfolge verglichen mit pH = 4.1 nicht ändern. Dies stimmt jedoch nicht vollständig mit den experimentellen Befunden überein. Was die Elutionsreihenfolge anbetrifft, beobachtet man das erwartete Verhalten. Was allerdings die Elutionsstärke anbetrifft, werden die Erwartungen nicht erfüllt – man beobachtet eine Abnahme der Adsorption bei allen Proben. Somit weicht das Verhalten bei diesem pH vom Modell ab. Offensichtlich spielen zusätzliche Faktoren hierbei eine Rolle. Auf eine weitere Aufklärung des bei diesem pH-Wert beobachteten Verhaltens wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet, da dies nicht das primäre Ziel der Arbeit war.

Zusätzlich ist interessant festzustellen, dass das Chromatogramm der Avicel 5 bei pH = 4.76 ein leichtes Tailing aufweist, während das Chromatogramm dieser Probe bei pH = 4.10 ein leichtes Fronting zeigt. Bei pH = 4.54 besitzt Avicel 5 ein nahezu symmetrisches Elutionsprofil. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachteten Kurvenformen für diese Probe nicht durch die experimentellen Artefakte, sondern durch die strukturellen Eigenschaften der Probe selbst verursacht wurden.

Vergleicht man die Elutionskurven der hochmolekularen BWLs mit denen der niedermolekularen Avicels bei vergleichbaren DS-Werten kann mit Ausnahme von pH = 4.54 bei den BWLs eine leichte Verschiebung zu höheren Elutionsvolumen festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass neben dem DS-Wert auch die Molmasse die Retention leicht beeinflusst. Es ist bekannt (siehe theoretischer Teil), dass in der Gradientenchromatographie bei relativ kleinen Molmassen die Kettenlänge die Retention beeinflusst, da diese Ketten nicht bei den kritischen Eluentenzusammensetzungen, sondern noch bevor diese erreicht werden, eluieren. Dabei kommt es zur stärkeren Retention je höher die Kettenlänge des Moleküls ist,

da bei längeren Ketten mehr Möglichkeiten zu adsorptiven Wechselwirkungen verglichen mit kürzeren Ketten bestehen. Der Einfluss der Kettenlängen verschwindet allerdings bei höheren Molekulargewichten, da diese nur bei den Eluentenzusammensetzungen, die nahezu mit den kritischen Eluentenzusammensetzungen übereinstimmen, eluieren. Somit belegt das gefundene Verhalten, dass jedenfalls für Avicels die kritische Molmasse, ab der die Kettenlänge keinen Einfluss mehr auf die Trennung ausübt, noch nicht erreicht wurde.

Wenn die Trennungen bei  $\text{pH} = 4.10$  und  $\text{pH} = 4.76$ , die eine vollständige und DS-abhängige Retention aufweisen, miteinander verglichen werden, wird deutlich, dass bei  $\text{pH} = 4.10$  die Proben insgesamt stärker retardieren. Gleichzeitig ist auch die Trennung der Proben mit den unterschiedlichen DS-Werten für diesen pH-Wert besser. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen bei  $\text{pH} = 4.10$  in 100 mmol/L Ammoniumacetatpuffer gearbeitet.

#### *Optimierung der Trennung nach DS durch die Veränderung der Gradientensteilheit*

Um eine Optimierung der Gradiententrennung zu erzielen wurde die Gradientensteilheit verringert. Dazu wurde ein 40 minütiger linearer Gradient von Wasser/Methanol = 95/5 nach 65/35 verwendet. Wie oben erwähnt, eluieren hochmolekulare Polymerketten im Gradienten bei den Eluentenzusammensetzungen, die mit den kritischen Eluentenzusammensetzungen annähernd übereinstimmen, wodurch bei diesen Ketten im Gradienten keine Molekulargewichtsabhängigkeit des Elutionsvolumens beobachtet wird. In flacheren Gradienten werden diese kritischen Eluentenzusammensetzungen später als bei steileren Gradienten erreicht, woraus eine spätere Elution der Proben resultieren soll. Außerdem sollte in flacheren Gradienten auch die Auflösung hochmolekularer Proben unterschiedlicher chemischen Zusammensetzungen (und dadurch mit unterschiedlichen kritischen Punkten) zunehmen. Basierend auf dieser Überlegung wurden Experimente bei Verwendung des flacheren Gradienten durchgeführt. Allerdings eluieren niedermolekulare Proben im Gradienten nicht bei sondern schon geringfügig unterhalb der kritischen Eluentenzusammensetzung, was z.B. zumindest für Avicel-Proben zutrifft (siehe oben). Die Elution dieser Ketten ist molmassenabhängig. Diese Molmassenabhängigkeit auf die Retention kann neben der DS-Abhängigkeit auch von der Gradientensteilheit beeinflusst werden und sollte deswegen für solche Proben untersucht werden. Die unter Verwendung des flacheren Gradienten erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 26 dargestellt.

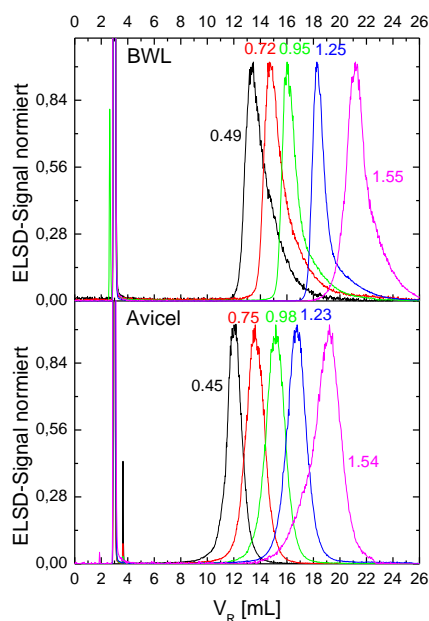


Abb. 26: Überlagerungen der Chromatogramme der BWLs (oben) und Avicels (unten) (BWL 1, Avicel 1 (schwarz), BWL 2, Avicel 2 (rot), BWL 3, Avicel 3 (grün), BWL 4, Avicel 4 (blau), und BWL 6, Avicel 5 (violett)) in einem 40 min linearen Gradienten von Wasser/Methanol = 95/5 nach 65/35 bei pH = 4.1. Injektionsvolumen 100  $\mu$ L. DS-Werte sind neben den Kurven angegeben.

Im jedem Chromatogramm der Abb. 26 wird analog zu Abb. 24 (für pH = 4.1) ein Peak am Totvolumen der Säule bei ca. 3 mL detektiert, welcher, wie erwähnt, durch Natriumacetat verursacht wird. Außerdem findet sich in jedem Chromatogramm zusätzlich ein Peak im Bereich des Gradienten zwischen 8 und 26 mL, welcher durch NaCMC hervorgerufen wurde. Analog zur Abb. 24 üben sowohl DS als auch die Molmasse einen Einfluss auf die Trennung aus.

Um den Einfluss der Gradientensteilheit auf die Trennung sowohl bezüglich DS, als auch Molmasse besser beurteilen zu können, sind in Abb. 27 die Elutionsvolumen am Peakmaximum jeweils für Avicels und BWLs sowohl im steilen (für pH = 4.1, Abb. 24) als auch im flachen (Abb. 26) Gradienten gegen den DS-Wert der Probe aufgetragen.

Zur besseren Veranschaulichung repräsentieren die roten und schwarzen Pfeile die Verschiebungen der Elutionsvolumen bezüglich DS, die blauen Pfeile bezüglich der Molmasse, jeweils am Beispiel von zwei Proben. Es zeigt sich, dass sich bei Verwendung des flacheren Gradienten die Trennung bezüglich DS für Avicel 3 und Avicel 5 um ca. 2.93 mL (4.03 mL – 1.1 mL) und für BWL 3 und BWL 6 um ca. 3.44 mL (5.07 mL – 1.63 mL) verbessert. Hingegen erhöht sich der Molmasseneinfluss auf die Trennung für das Probenpaar

ähnlicher DS-Werte Avicel 3 – BWL 3 nur um ca. 1.05 mL ( $1.57 \text{ mL} - 0.52 \text{ mL}$ ). Somit zeigt sich, dass durch die Senkung der Gradientensteilheit die Trennung bezüglich DS stärker beeinflusst wird, als die Trennung bezüglich der Molmasse. Daher wurden die weiteren Untersuchungen unter Verwendung des flächeren Gradienten (Steilheit  $0.75 \text{ %/min}$ ) durchgeführt.

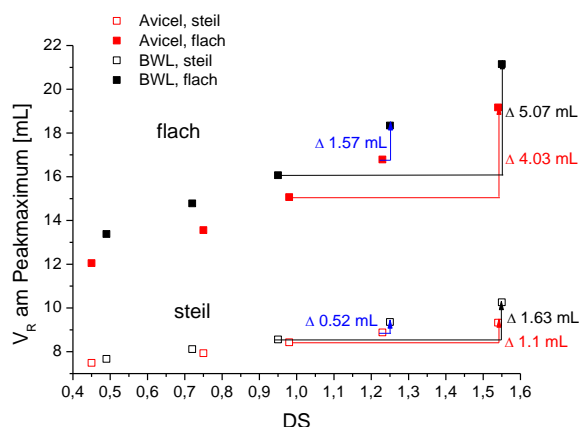


Abb. 27: Elutionsvolumen am Peakmaximum ( $V_R$ ) in den Chromatogrammen von NaCMCn jeweils im steileren (Abb. 24) und flacheren (Abb. 26) Gradienten als Funktion des DS. Die auf DS basierenden Effekte sind mit roten (für zwei Avicel Proben) und schwarzen (für zwei BWL Proben) Pfeilen, die Effekte bezüglich der Molmasse sind mit blauen Pfeilen (für eine Avicel und eine BWL ähnlicher DS) verdeutlicht.

Anhand von Abb. 26 wird deutlich, dass unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen für Proben gleicher Molmasse aber unterschiedlicher DS-Werte eine eindeutige Trennung nach DS stattfindet. Diese Ergebnisse deuten gleichzeitig darauf hin, dass auch innerhalb der einzelnen Proben eine Trennung nach DS der einzelnen Polymerketten erzielt wird. Der Nachweis dafür wird später mittels FTIR-Spektroskopie geführt. Somit können die erhaltenen Chromatogramme zur Berechnung der DS-Verteilungen innerhalb der individuellen Proben und somit zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität 1. Ordnung herangezogen werden. Zuvor soll jedoch auf die Wiederfindungen nach den chromatographischen Trennungen eingegangen werden.

Essentiell für eine flüssigchromatographische Trennmethode ist, dass auch tatsächlich Informationen zur gesamten auf die Säule aufgetragenen Probe erhalten werden. Daher wurden die Wiederfindungen der Proben nach der chromatographischen Trennung bestimmt. Dies erfolgte durch eine isokratische Elution bei der Eluentenzusammensetzung am Ende des Gradienten Wasser/Methanol = 65/35 (beide mit  $100 \text{ mmol/L}$  Ammoniumacetat und

446 mmol/L Essigsäure). Als Ergebniss wurde festgestellt, dass alle Avicel- und BWL-Proben nach der chromatographischen Trennung nahezu quantitativ wiedergefunden werden, wenn man sich auf die filtrierte Proben bezieht.

#### *Bestimmung der DS-Verteilungen von NaCMC-Proben und Quantifizierung der chemischen Heterogenität 1. Ordnung*

Nachdem nachgewiesen war, dass die erarbeitete chromatographische Methode zumindest für Proben gleicher Molekulargewichte eine Trennung nach DS ermöglicht und auch eine vollständige Wiederfindung belegt war, konnten die DS-Verteilungen der Proben bestimmt werden. Die DS-Verteilungen der Proben geben die Gewichtsanteile der Fraktionen mit einem spezifischen DS-Wert wieder. Diese DS-Verteilungen können basierend auf den Chromatogrammen mithilfe von Gleichung 23 berechnet werden:

$$w(\text{DS}) = \frac{S(V_R) \times \Delta V_R}{\Delta \text{DS}(V_R) \times \sum S(V_R) \times \Delta V_R}$$

Gleichung 23

wobei  $S(V_R)$  das ELSD-Signal beim Elutionsvolumen  $V_R$ , welches in der ersten Näherung proportional zur Massenkonzentration  $c$  der eluierenden Fraktion ist.  $\Delta V_R$  repräsentiert das gewählte Elutionsvolumenintervall und  $\Delta \text{DS}(V_R)$  das DS-Intervall innerhalb von  $\Delta V_R$ .

Um den Quotienten  $\Delta \text{DS} / \Delta V_R$  zu bilden werden die Kalibrierkurven benötigt, welche die Abhängigkeit des Substitutionsgrades DS vom Elutionsvolumen  $V_R$  beschreiben. Da einige Chromatogramme ein ausgeprägtes Fronting bzw. Tailing aufweisen, beschreibt deren Peakmaximum nicht zwangsläufig den gewichtsmittleren DS-Wert. Daher wurden die Kalibrationskurven erstellt, indem für die Proben der gewichtsmittlere Substitutionsgrad aus Tab. 15 gegen das Elutionsvolumen des Meridians,  $V_{R,mc}$ , des Peaks aus Abb. 26 aufgetragen wurde (siehe Abb. 28). Die Rechtfertigung hierfür ergibt sich daraus, dass nach Gleichung 23 der Meridian den gewichtsmittleren DS-Wert korrekt beschreiben sollte, wenn man einen linearen Zusammenhang zwischen DS und  $V_R$  über den Elutionsbereich der individuellen Proben annimmt.

In Abb. 28 steigt der DS-Wert mit  $V_{R,mc}$  an, was die beschriebene Trennung der Proben nach DS belegt. Die Parallelverschiebung der beiden Kurven resultiert aus dem noch bestehenden

Molmasseneinfluss. Die Chromatogramme aus Abb. 26 und die Kalibrierkurven aus Abb. 28 wurden verwendet, um die DS-Verteilungen zu berechnen. Aus diesen DS-Verteilungen sind wichtige Informationen darüber zugänglich, wie die Synthesebedingungen die chemische Heterogenität vor allem 1. Ordnung und diese wiederum die Anwendungseigenschaften der NaCMCn beeinflussen. Die erhaltenen DS-Verteilungen sind in Abb. 29 dargestellt.

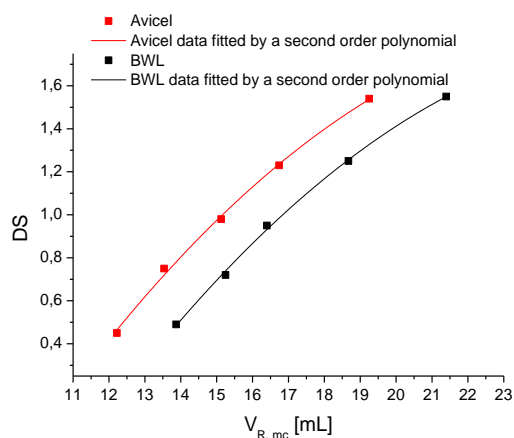


Abb. 28: Kalibrierkurven zur Berechnung der DS-Verteilungen der Proben Avicels (rot), BWLs (schwarz). Die beiden Anpassungen geben Polynome zweiter Ordnung wieder.

Die Avicel-Proben zeigen mit Ausnahme von Avicel 5 annähernd symmetrische Verteilungen. Avicel 5 weist ein leichtes Fronting zu den kleinen DS-Werten auf. Im Gegensatz dazu besitzen die BWL-Proben unsymmetrische Verteilungen, mit ausgeprägtem Tailing zu höheren DS-Werten. BWL 6 weist daneben analog zu Avicel 5 ein leichtes Fronting zu den kleinen DS-Werten auf. Sowohl Avicel 5 als auch BWL 6, also die beiden Proben mit den höchsten DS-Werten innerhalb der entsprechenden Reihen, wurden im Gegensatz zu den anderen Proben in zwei Stufen derivatisiert. Da nur diese Proben das Fronting zu niedrigeren DS-Werten aufweisen, liegt der Verdacht nahe, dass die zweite Stufe der Carboxymethylierung, bei welcher nicht die reine Cellulose, sondern die bereits substituierte NaCMC als Ausgangsmaterial verwendet wird, nach einem etwas abweichenden Mechanismus abläuft.

Um die Plausibilität der erhaltenen DS-Verteilungen zu überprüfen, wurden basierend auf diesen Verteilungen die gewichtsmittleren DS-Werte ( $DS_{\text{rück}}$ ) mithilfe von Gleichung 24 zurückberechnet.

$$DS_{\text{rück}} = \sum w(DS) \times DS \times \Delta DS$$

Gleichung 24

Diese Werte sowie ihre relativen Abweichungen von den mittleren DS-Werten, die mit HPLC nach vollständigem Abbau bestimmt wurden (aus Tab. 15), sind in Tab. 9 angegeben.

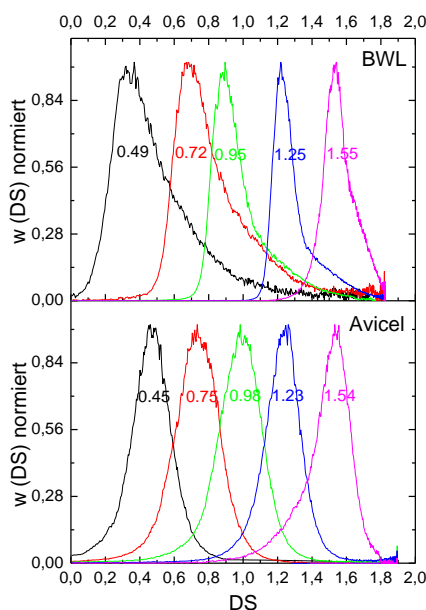


Abb. 29: Überlagerungen der DS-Verteilungen der untersuchten Proben: BWL 1, Avicel 1 (schwarz), BWL 2, Avicel 2 (rot), BWL 3, Avicel 3 (grün), BWL 4, Avicel 4 (blau), BWL 6, Avicel 5 (violett). Die Werte neben den Kurven repräsentieren die mittleren DS-Werte aus Tab. 15.

Mit Ausnahme von BWL 2 liegen alle Abweichungen in Tab. 9 zwischen 0 – 6.1 %, was eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten DS-Werten belegt. Dies wurde auch erwartet, da zur Erstellung der Kalibrierkurve die DS-Werte aus Tab. 15 als Eingangsgrößen eingesetzt wurden. Nur für BWL 2 resultierte eine höhere Abweichung von 15.3 %. Dies kann verschiedene Ursachen haben: z.B. dass die Anpassung des Elutionsvolumens an DS (Kalibrierkurven in Abb. 28) auf DS-Werten basierte, die nicht zwangsläufig das Zentrum des Chromatogramms repräsentieren. Zusätzlich könnte BWL 2 ein anderes AGU-Substitutionsmuster und/oder Kettenaufbau (chemische Heterogenität 2. Ordnung) besitzen, welche die Retention dieser Probe im verwendeten Gradienten auf einer anderen Weise beeinflussen als bei den anderen BWLs. Die Nichtlinearität des ELSD-Signales und die Abhängigkeit des ELSD-Responses von DS und/oder Molmasse als Fehlerquellen können hierbei ausgeschlossen werden, wie im folgenden Abschnitt belegt wird.



Tab. 9: Aus den DS-Verteilungen berechnete gewichtsmittlere DS-Werte ( $DS_{\text{rück}}$ ) und ihre relativen Abweichungen von den DS-Werten aus Tab. 15. DS-Standardabweichung (SD) für Avicels und BWLs.

Probe	$DS_{\text{rück}}$	Relative Abweichung von DS aus Tab. 15 [%]	SD
Avicel 1	0.46	2.2	0.17
Avicel 2	0.72	4.0	0.16
Avicel 3	0.98	0.0	0.17
Avicel 4	1.23	0.0	0.17
Avicel 5	1.48	3.9	0.18
BWL 1	0.52	6.1	0.26
BWL 2	0.83	15.3	0.26
BWL 3	0.99	4.2	0.19
BWL 4	1.29	3.2	0.14
BWL 6	1.55	0.0	0.10

Bei der Berechnung der DS-Verteilungen nach Gleichung 23 wird angenommen, dass das Detektorsignal  $S(V_R)$  proportional zur Massenkonzentration der eluierenden Fraktion ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass das ELSD-Signal i.A. nicht linear mit der Konzentration verläuft [96, 97]. Daneben wird beschrieben, dass das ELSD-Signal neben der Massenkonzentration noch von den anderen Parametern, wie z.B. Molmasse, chemischer Zusammensetzung sowie Eluentenzusammensetzung, beeinflusst wird [97]. Im Verlaufe des verwendeten Gradienten ändert sich die Eluentenzusammensetzung entlang des Chromatogramms. Zusätzlich ändert sich aufgrund der erzielten Trennung nach DS auch die chemische Zusammensetzung über den Peak. Schließlich könnte auch die Molmasse bei unterschiedlichen Elutionszeiten unterschiedliche Werte aufweisen. Daher wurde der Einfluss dieser Parameter auf das ELSD-Signal untersucht. Hierzu wurden gleiche Mengen von Proben mit unterschiedlichen DS-Werten bzw. Molmassen bei unterschiedlichen isokratischen Eluentenzusammensetzungen ohne Säule in das chromatographische System injiziert. Die erhaltenen Peakflächen für die verschiedenen Proben und Eluentenzusammensetzungen wurden anschließend miteinander verglichen. Dabei konnten keine systematischen Abhängigkeiten des ELSD-Signals von DS oder Molmasse erkannt

werden. Gleichzeitig veränderte sich die Signalintensität mit der Eluentenzusammensetzung um maximal 10 % im Bereich der Eluentenzusammensetzungen, die während der Probenelution überstrichen werden. Deshalb wurden die DS-Verteilungen in Abb. 29 ohne Korrekturen für Molmasse, DS oder Eluentenzusammensetzung nach Gleichung 23 berechnet.

Zur Quantifizierung der Heterogenität bezüglich DS wurden aus den berechneten DS-Verteilungen die DS-Standardabweichungen (SD) mithilfe von Gleichung 25 bestimmt. Die DS-Standardabweichung beschreibt die Streuung der DS-Werte individueller Ketten einer Probe um den gewichtsmittleren DS-Wert dieser Probe und kann somit als Maß für die DS-Heterogenität innerhalb einer Probe verwendet werden, mittels dessen die chemische Heterogenität 1. Ordnung quantifiziert werden kann. Die erhaltenen SD-Werte sind ebenfalls in Tab. 9 angegeben.

$$SD = \sqrt{\sum w(DS) \times (DS - DS_{\text{rück}})^2 \times \Delta DS}$$

Gleichung 25

Zur besseren Veranschaulichung wie sich der SD-Wert für die Proben mit dem mittleren Substitutionsgrad (DS-Wert) verhält wurde dieser als Funktion von DS aus Tab. 15 jeweils für Avicels und BWLs aufgetragen (siehe Abb. 30).

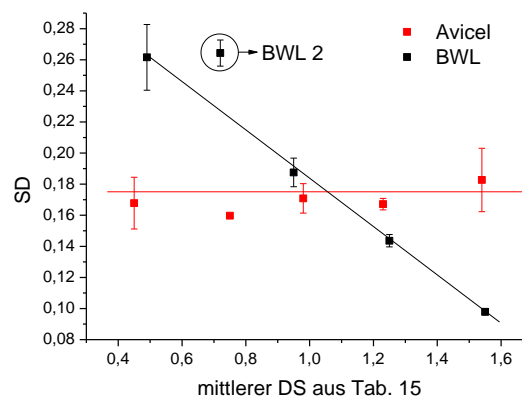


Abb. 30: DS-Standardabweichung (SD) mit dem aus Doppelbestimmung resultierenden Fehlerbalken als Funktion des mittleren DS-Wertes aus Tab. 15 jeweils für Avicels (rot) und BWLs (schwarz). Die Linien dienen lediglich als Hilfe für das Auge.

Für die beiden Probenreihen werden deutlich unterschiedliche Abhängigkeiten des SD-Wertes vom mittleren DS-Wert gefunden. Während die SD-Werte der Avicel-Proben nahezu

unabhängig vom mittleren DS sind, sinken die SD-Werte mit steigendem DS für die BWL-Proben. Das bedeutet, dass die DS-Verteilungen der BWLs mit dem steigenden DS-Wert zunehmend schmaler werden, während für Avicels die DS-Verteilungen für die unterschiedlichen mittleren DS-Werte im untersuchten Bereich annähernd gleich breit sind.

Um diese Ergebnisse besser verstehen und erklären zu können, wird zunächst betrachtet, wie sich die chemische Heterogenität 1. Ordnung, welche die berechneten DS-Verteilungen eigentlich beschreiben sollen, und der SD-Wert dieser DS-Verteilungen mit steigendem mittleren DS-Wert der Probe verhalten sollte. Zunächst ist klar, dass bei  $DS = 0$  (also bei reiner Cellulose) und bei  $DS = 3$  (also bei einer vollständig substituierten NaCMC) eine chemisch vollständig homogene Probe vorliegt, und somit der SD-Wert null beträgt. Folglich ist auch klar, dass der SD-Wert und die chemische Heterogenität bei einem  $0 < DS < 3$  ein Maximum durchlaufen muss, da aufgrund der statistischen Prozesse in diesem DS-Bereich eine DS-Verteilung erwartet wird, unabhängig davon, welches Molekulargewicht die Probe hat, wie sie synthetisiert wurde und wie die Substitution (z.B. statistisch oder nicht) abläuft.

Die Lage des SD-Maximums kann dabei abhängig vom Molekulargewicht, den experimentellen Bedingungen und dem Ablauf der Reaktion variieren. Im Folgenden soll daher überlegt werden, welchen Einfluss das Molekulargewicht auf die Funktion  $SD = f(DS)$  haben sollte, wenn die Derivatisierung statistisch abläuft, d.h. wenn alle OH-Gruppen der Cellulose gleich gut zugänglich bzw. gleich reaktiv sind. Bei einer statistischen Derivatisierung erfolgt die Substitution vollkommen nach dem Zufallsprinzip. D.h. die Wahrscheinlichkeit, dass eine OH-Gruppe in einer Cellulosekette substituiert wird, ist proportional zur Anzahl der freien OH-Gruppen in dieser Kette. Wenn bei einer niedermolekularen Kette (z.B. einem Trimer) eine OH-Gruppe substituiert wurde, dann sinkt die Wahrscheinlichkeit für eine weitere Substitution der Kette verglichen mit der Erstsitution relativ deutlich. Dies führt dazu, dass bei Proben mit kleinen Molmassen mit steigendem DS-Wert der Probe (fortschreitender Reaktion) schnell immer neue unsubstituierte Ketten mit einer hohen Reaktionswahrscheinlichkeit in den Prozess einbezogen und substituiert werden. Das heißt allerdings nicht, dass die Zweit- und weiteren Substitutionen dadurch gestoppt werden. Im Gegensatz, sie finden parallel zu den Erstsitutionen statt, allerdings wie erwähnt, mit kleineren Reaktionswahrscheinlichkeiten. Dadurch sollte die DS-Heterogenität über die Ketten schnell ansteigen, was dazu führt, dass das SD-Maximum der Heterogenität 1. Ordnung früh bei relativ kleinen DS-Werten erreicht

wird. Bei hochmolekularen Ketten dagegen (z.B. beim DP 100) fällt die Wahrscheinlichkeit der zweiten Substitution der Kette verglichen mit der Erstsitution deutlich schwächer ab als bei den niedermolekularen Ketten. Dies soll dazu führen, dass die DS-Heterogenität über die Ketten langsamer mit DS ansteigt und deswegen das SD-Maximum bei höheren DS-Werten verglichen mit niedermolekularen Proben detektiert wird. Aus dem gleichen Grund wird erwartet, dass niedermolekulare Proben insgesamt höhere SD-Werte als hochmolekulare aufweisen. Diese Erwartungen sind in Abb. 31 schematisch dargestellt.

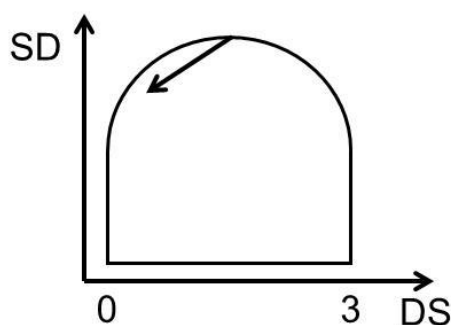


Abb. 31: Schematische Darstellung der Abhängigkeit  $SD = f(DS)$ , welche bei einer statistischen Derivatisierung erwartet wird. Der Pfeil repräsentiert Verschiebung des Maximums mit sinkendem Molekulargewicht.

Wenn jetzt dieses Modell mit den experimentellen Ergebnissen verglichen wird, dann scheint es für Avicel keine Übereinstimmung der erhaltenen Abhängigkeit in Abb. 30 mit dem statistischen Modell zu geben. Für BWLs würden die Ergebnisse mit dem Modell annähernd übereinstimmen, wenn das Maximum des SD-Wertes bei  $\leq 0.4$  liegen würde, was außerhalb des untersuchten DS-Bereiches ist. Dennoch könnte die Tatsache, dass es sich bei BWLs um hochmolekulare Proben handelt, bei denen das SD-Maximum eher später erwartet wird, eventuell einen Hinweis darauf sein, dass auch bei BWLs ein abweichendes vom Modell Verhalten existiert.

Hierbei sollen unbedingt die folgenden potentiellen Fehlerquellen erwähnt werden, die die beobachteten Abweichungen zum Teil erklären können. Als erste Fehlerquelle könnte die Tatsache sein, dass die unterschiedlichen absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten an den drei OH-Gruppen der AGUs ( $O-2 > O-6 \gg O-3$ ) in der obigen Diskussion nicht berücksichtigt wurden. Weitere Fehlerquellen könnten sein, dass die DS-Verteilungen in Abb. 29 keine reine chemische Heterogenität 1. Ordnung darstellen. Dies ist dann der Fall, wenn außer DS noch andere Parameter wie Molmasse, chemische Heterogenität 2. Ordnung und/oder das

Substitutionsmuster die Retention in der Gradientenchromatographie beeinflussen. Der Einfluss der Molmasse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht und wird später weiter diskutiert. Dagegen konnte der Einfluss anderer Heterogenitätsarten mangels geeigneter Proben nicht untersucht werden.

Auffällig ist, dass BWL 2 in Abb. 30 einen höheren SD-Wert aufweist, als aufgrund der annähernd linearen Abhängigkeit der SD von DS für diese Probenserie zu erwarten wäre. Dies ist neben der detektierten größeren Abweichung zwischen  $DS_{\text{rück}}$  und DS ein Hinweis auf ein irreguläres Verhalten dieser Probe verglichen mit anderen BWLs.

#### *Gradiententrennungen technischer NaCMC-Proben*

Die bisher dargestellten Ergebnisse bezogen sich auf Modellpolymere, die speziell für die Untersuchungen in dieser Arbeit synthetisiert wurden. Um festzustellen, ob analoge Ergebnisse auch für typische industriell hergestellten Proben erhalten werden können, wurden die technischen Proben (Rad 79, Rad 62 und Rad 80, Tab. 15) analog untersucht. Diese Ergebnisse werden allerdings im Detail nicht aufgeführt, da sich die grundlegenden Zusammenhänge verglichen mit den Laborproben nicht ändern. Die technischen Proben zeigen analog zu den Avicels und BWLs pH-abhängige Trennungen nach DS auf der gewählten stationären Phase, wobei auch hier die Molmasse einen leichten Einfluss auf die Retention ausübt. Auch hier konnte die beste Trennung für  $\text{pH} = 4.1$  erzielt werden. Diese Trennung ist für vier Proben sowie eine Mischung aus zwei technischen NaCMCn unterschiedlicher DS-Werte in Abb. 32 dargestellt.

Analog zu den Laborproben zeigen auch die technischen Proben und deren Mischung in der Gradientenchromatographie je zwei getrennte Peaks. Der Peak am Totvolumen der Säule (3 mL) wird durch das Natriumacetat verursacht. Der zweite Peak im Elutionsbereich 8 – 13 mL, stammt von der CMC. Sowohl der DS als auch die Viskosität der Probe steigen mit dem Elutionsvolumen an (Abb. 32, links), was belegt, dass die beiden Parameter (DS und Molmasse) die Retention beeinflussen. Hierbei wurde die Viskosität als ein Maß für die Molmasse verwendet. Allerdings ist auch für diese Proben der Molmasseneinfluss im untersuchten Bereich gegenüber dem DS-Einfluss nur schwach ausgeprägt. In der rechten Graphik ist das Chromatogramm einer Mischung der Proben Rad 79 und Rad 80 gezeigt. Die zwei ausgeprägten Maxima zeigen, dass die Probenmischung in ihre chemisch unterschiedlichen Bestandteile getrennt wurde. Da der Elutionsbereich der Mischung mit den

Elutionsbereichen der individuellen Mischungskomponenten (siehe linke Graphik, Proben Rad 79 und Rad 80) übereinstimmt, kann geschlossen werden, dass durch das Mischen der Proben die Retention nicht beeinflusst wird. Somit ist belegt, dass es mit der entwickelten Methode möglich ist, NaCMC-Mischungen bezüglich DS zu trennen, was z.B. die Möglichkeit eröffnet Mischungen von Wettbewerbern zu entschlüsseln oder Patentverletzungen nachzuweisen.

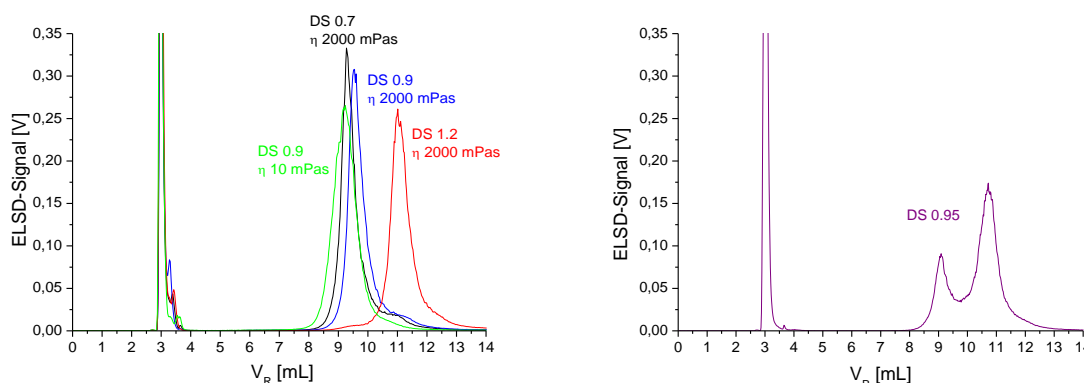


Abb. 32: Überlagerung der Chromatogramme der technischen NaCMC-Proben in einem 40 min linearen Gradienten von  $\text{H}_2\text{O}/\text{Methanol} = 95/5$  nach  $20/80$  mit Puffer. Links: Rad 79 (schwarz), Rad 62 (blau), Rad 80 (rot), Rad 78 (grün), rechts: Mischung der Proben Rad 79 + Rad 80 ( $w/w = 1/1$ ). Bei allen gezeigten Messungen war der Puffer nur dem Wasser zugesetzt. Injektionsvolumen  $100\ \mu\text{L}$ . Gesamtprobenkonzentration  $1.25\ \text{g/L}$ .

An den technischen Proben wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss es hat, wenn der Ammoniumacetatpuffer nur dem Wasser aber nicht dem organischen Modifier zugesetzt wird. Hierbei zeigte sich eine leichte und annähernd für alle Proben gleiche Verschiebung zu höheren Elutionsvolumen. Das grundlegende Verhalten der Trennungen änderte sich dabei allerdings nicht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass erfolgreich eine pH-abhängige Gradientenmethode entwickelt wurde, mit derer Hilfe NaCMCn mit den DS-Werten  $0.45 - 1.55$  entsprechend ihrer DS-Werte voneinander getrennt werden können. Die Molmasse übt einen leichten Einfluss auf das Retentionsvolumen aus. Die Methode erlaubt die Bestimmung der DS-Verteilungen innerhalb der Proben. Es wurde festgestellt, dass sich die Proben, die durch eine zweistufige Synthese hergestellt wurden, bezüglich der Form der Chromatogramme und der DS-Verteilungen von den Proben unterscheiden, die in nur einem Schritt synthetisiert wurden. Die auf der Basis der DS-Verteilungen ermittelten DS-Standardabweichungen (SD) wurden als Maß für die chemische Heterogenität 1. Ordnung der

Proben berechnet. Es konnte festgestellt werden, dass die chemische Heterogenität 1. Ordnung für die niedermolekularen Avicels im untersuchten DS-Bereich nicht vom mittleren DS-Wert abhängt. Hingegen nimmt die chemische Heterogenität 1. Ordnung der hochmolekularen BWL-Proben mit steigendem mittlerem DS-Wert ab. Es konnte festgestellt werden, dass die erhaltenen Abhängigkeiten der Standardabweichung vom DS nicht in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit betrachteten statistischen Modell stehen.

Die Berechnungen der DS-Verteilungen und der DS-Heterogenitäten basierten auf der Annahme, dass mit der entwickelten Gradientenmethode nicht nur Proben unterschiedlicher DS-Werte voneinander getrennt werden, sondern auch über den Peak einer einzelnen Probe, eine Trennung nach dem DS der einzelnen Polymerketten stattfindet. Um dies mit weiteren Methoden experimentell zu belegen wurden Versuche unternommen, um die DS-Werte einzelner Gradientenfraktionen zu ermitteln und somit ihren Verlauf über den Polymerpeak zu bestimmen. Diese Versuche sind im nächsten Kapitel beschrieben.

#### **4.3 Charakterisierung der Gradientenfraktionen**

Um die Trennung nach DS über den Peak einer einzelnen Probe zu beweisen, wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt: die HPLC nach vollständigem Kettenabbau und die FTIR-Spektroskopie. Ein Parameter, welcher bei der Methodenauswahl essentiell war, ist die Methodenempfindlichkeit, da die getrennten Gradientenfraktionen unter den gegebenen Bedingungen sehr verdünnt mit Konzentrationen von max. 10 µg/mL vorliegen. Der zweite wichtige Punkt bei der Methodenauswahl war die Automatisierbarkeit um Zeit und Kosten zu sparen. Dabei hängt die Automatisierbarkeit des Vorhabens unter anderem mit der Empfindlichkeit der angekoppelten Methode zusammen, da bei empfindlichen Methoden eine aufwendigere automatisierbare mehrfache Fraktionierung entfällt. Schließlich wurden bereits etablierte Charakterisierungsmethoden für NaCMCn einer vollständigen Neuentwicklung vorgezogen. Bei der HPLC nach vollständigem Kettenabbau handelt es sich um eine bereits etablierte Charakterisierungsmethode für NaCMCn. Theoretisch müssen hierbei lediglich die Konzentrationen der Reaktanden auf den Detektor und aufeinander abgestimmt werden. Die FTIR-Spektroskopie ist eine empfindliche Methode und kann mithilfe eines speziellen Interfaces mit der Chromatographie semi-online gekoppelt werden um die chromatographischen Fraktionen bezüglich chemischer Zusammensetzung zu charakterisieren. LC-FTIR-Kopplungen sind für NaCMCn in der Literatur noch nicht

beschrieben. Jedoch wurde die genannte Kopplung bereits zur Charakterisierung chemischer Zusammensetzungsverteilungen anderer synthetischen Polymere (siehe theoretische Teil) erfolgreich eingesetzt.

#### **4.3.1. Versuche zur Charakterisierung der Gradientenfraktionen mittels HPLC nach vollständigem Kettenabbau**

Die gängige Methode zur Charakterisierung des DS der Cellulosederivate besteht im vollständigen Abbau der Polymerketten bis zu den Monomeren und der anschließenden quantitativen chromatographischen Auftrennung der gebildeten monomeren Carboxymethyl(CM) – Glucosen (siehe Einleitung). Da die HPLC eine sehr leistungsfähige und empfindliche Methode darstellt, wurde geprüft, ob der Ansatz des vollständigen Abbaus und der HPLC-Trennung auch für die Charakterisierung der chromatographischen Fraktionen geeignet sein könnte.

Hierzu war es notwendig zunächst Erfahrungen mit den in der Literatur beschriebenen Methoden zu sammeln, um dann zu prüfen, ob sich das Vorgehen auch auf die chromatographischen Fraktionen übertragen lässt.

##### *Aufbau einer HPLC-Methode nach vollständigem Kettenabbau für die Originalproben*

Um die NaCMC-Polymerketten vollständig bis zu Monomeren abzubauen wurden die Ausgangsmaterialien entsprechend den in der Literatur [32] beschriebenen Verfahren mittels einer starken Mineralsäure hydrolysiert. Das Verhältnis von Säure zu Polymer sowie die Säurekonzentration in der Reaktionsmischung wurden analog der Literaturbedingungen beibehalten. Die Hydrolyse unter Verwendung der in der Literatur genannten Konzentrationsverhältnisse wird im Weiteren als Standardhydrolyse bezeichnet. Nach der Hydrolyse wurde die Reaktionslösung neutralisiert, filtriert und direkt für die anschließende Chromatographie verwendet.

Zunächst wurde untersucht ob die Standardhydrolyse erfolgreich und vollständig stattfand. Dazu wurden die hydrolysierte sowie die nicht hydrolysierte Probe BWL 3 unter den SEC-Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.1) gemessen. Dabei wurden die Konzentration und das Injektionsvolumen des Hydrolysates so gewählt, dass vergleichbare Mengen an AGUs in das System injiziert wurden, wie für die nicht hydrolysierte Probe. Die Überlagerung der Chromatogramme ist in Abb. 33 dargestellt.



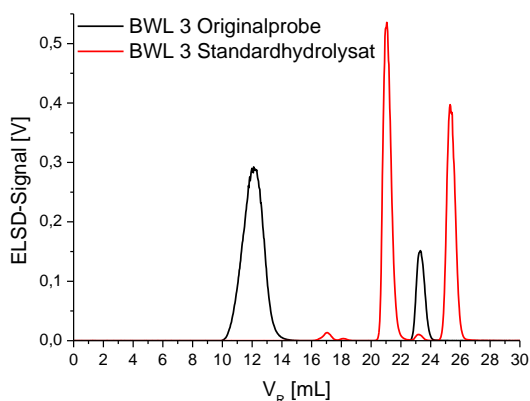


Abb. 33: Überlagerung der SEC-Chromatogramme der Probe BWL 3 ohne Hydrolyse (schwarz, 1.25 g/L, Injektionsvolumen 100  $\mu$ L) und des Hydrolysates der Standardhydrolyse (rot, die nominelle CMC-Konzentration betrug ca. 4.50 g/L, Injektionsvolumen 20  $\mu$ L).

Wie schon im Kapitel 4.1 beschrieben, eluiert die nicht hydrolysierte Probe unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen zwischen 9.5 und 15 mL. Im Standardhydrolysat hingegen finden sich in diesem Bereich keine Signale. Auch nach der Erhöhung des Injektionsvolumens des Hydrolysates auf 100  $\mu$ L konnte kein zum Polymeren korrespondierender Peak detektiert werden. Hingegen werden Peaks oberhalb von 16 mL detektiert, welche zu Molmassen von unterhalb 1000 g/mol korrespondieren. Diese Peaks resultieren beim Standardhydrolysat aus den niedermolekularen anorganischen Verbindungen wie  $\text{KClO}_4$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{KOAc}$  und/oder aus den gebildeten CM-Glucosen (Carboxymethylglucosen). Der kleine Peak bei ca. 17 mL kann dabei eventuell auf die Di-, Tri- und Tetramere der CM-Glucosen zurückgeführt werden. Auf jeden Fall deutet die Abwesenheit des Signals im hochmolekularen Bereich des Chromatogramms des Standardhydrolysates darauf hin, dass nach der Standardhydrolyse keine nennenswerten hochpolymeren Bestandteile mehr vorhanden sind. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hydrolyse erfolgreich und vollständig war.

Zur Bestimmung des DS ist die chromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte in Glucose sowie mono-, di-, und tri-substituierten CM-Glucosen notwendig. Hierzu wurden zwei unterschiedlichen Methoden geprüft. Die erste basiert auf der Verwendung einer Anionenaustauschersäule und eines Salzgradienten in Anlehnung an Saake et al. [32]. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit wurde in der zitierten Arbeit jedoch eine präparative Chromatographiesäule eingesetzt. Hierbei eluierten die AGUs in der Reihenfolge ansteigenden Substitutionsgrades. Die Detektion erfolgte mittels eines Chiralitätsdetektors

(Chiralysers), bei welcher die optische Drehung, hervorgerufen durch die Glucosederivate, gemessen wird. Anorganische Salze werden durch diesen Detektor nicht erfasst. Der Nachteil des Chiralitätsdetektors liegt jedoch in seiner relativ geringen Empfindlichkeit.

Die Chromatogramme der Trennungen der Standardhydrolysate der Proben BWL 3 und BWL 6 sind in Abb. 34 dargestellt.

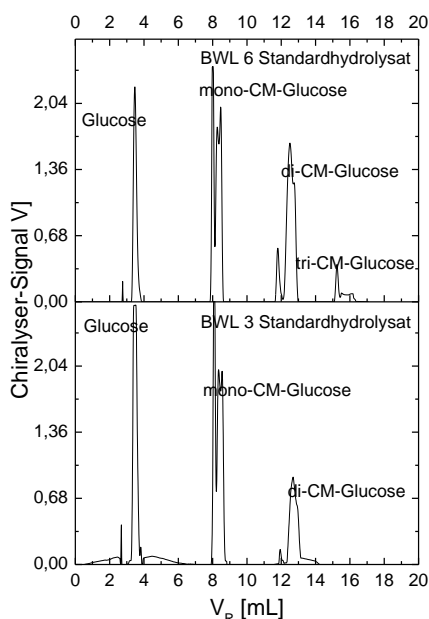


Abb. 34: Chromatogramme der Standardhydrolysate von BWL 3 (unten) und BWL 6 (oben) mittels Anionenaustauschchromatographie. Injektionsvolumen 50  $\mu$ L. Die nominelle CMC-Konzentration betrug ca. 4.5 g/L.

Im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates können vier Peakgruppen detektiert werden. Der Peak am Totvolumen der Säule bei ca. 3.5 mL korrespondiert zur Glucose, was durch die Injektion der reinen Glucose verifiziert wurde. Die Peaks zwischen 7.5 und 8.5 mL sowie zwischen 11.5 und 13.5 mL wurden fraktioniert und mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie als mono- bzw. di-CM-Glucosederivate identifiziert (Spektren siehe Abb. 35 und Abb. 36). Dabei konnten im Spektrum der Abb. 35 die fünf intensivsten Peaks den Na- und K-Salzen der mono-CM-Glucosen sowie deren  $K^+$ - bzw.  $Na^+$ -Addukten zugeordnet werden. Im Spektrum der Abb. 36 konnten die Peaks bei  $m/z = 318.7$  und  $334.6$  jeweils den NaH- und KH-Salzen der di-CM-Glucose zugeordnet werden, wobei einer der CM-Substituenten als ein Na(K)-Salz und der andere CM-Substituent als Säure vorliegt. Der Ursprung des Peaks bei ca. 14.5 mL konnte mit dieser Methode nicht eindeutig geklärt

werden, da die Konzentration dieser Fraktion zu gering war. Die Elutionsreihenfolge der identifizierten Glucosen stimmt jedoch mit der Literatur [32] überein. Daher kann angenommen werden, dass der Peak bei 14.5 mL, wie in der Literatur beschrieben, aus der tri-substituierten CM-Glucose resultiert.

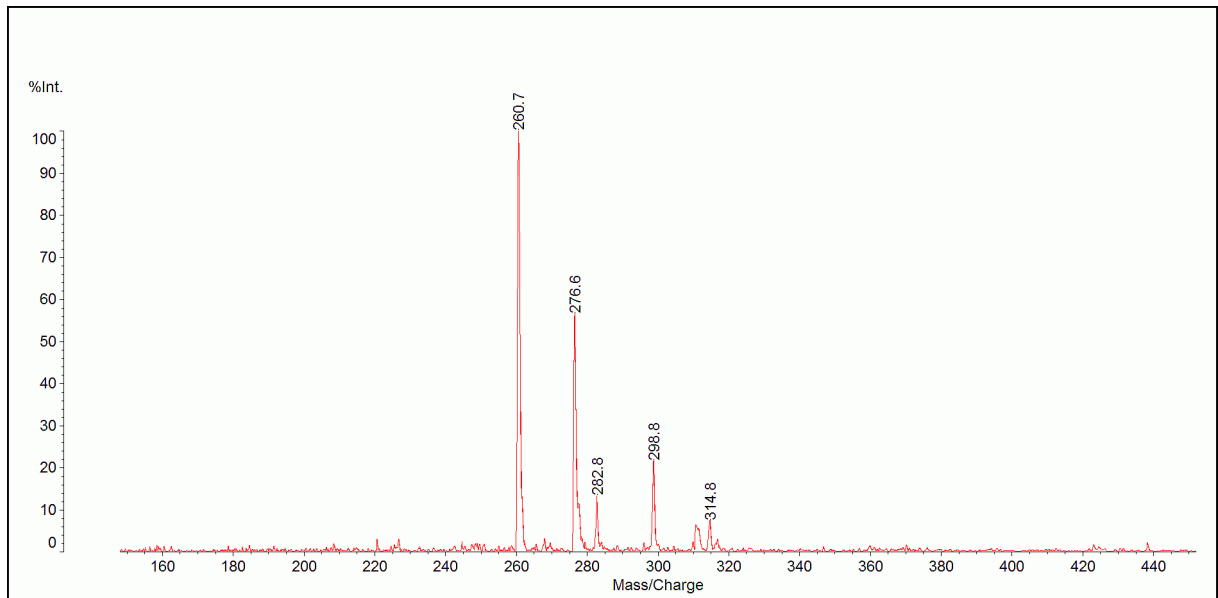


Abb. 35: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 7.5 und 8.5 mL im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates aus Abb. 34. Identifizierte Molekülionen:  $m/z = 260.7$  [mono-CM-Glucose]Na<sup>+</sup>,  $m/z = 276.6$  [mono-CM-Glucose]K<sup>+</sup>,  $m/z = 282.8$  [mono-CM-Glucose]NaNa<sup>+</sup>,  $m/z = 298.8$  [mono-CM-Glucose]NaK<sup>+</sup>,  $m/z = 314.8$  [mono-CM-Glucose]KK<sup>+</sup>.

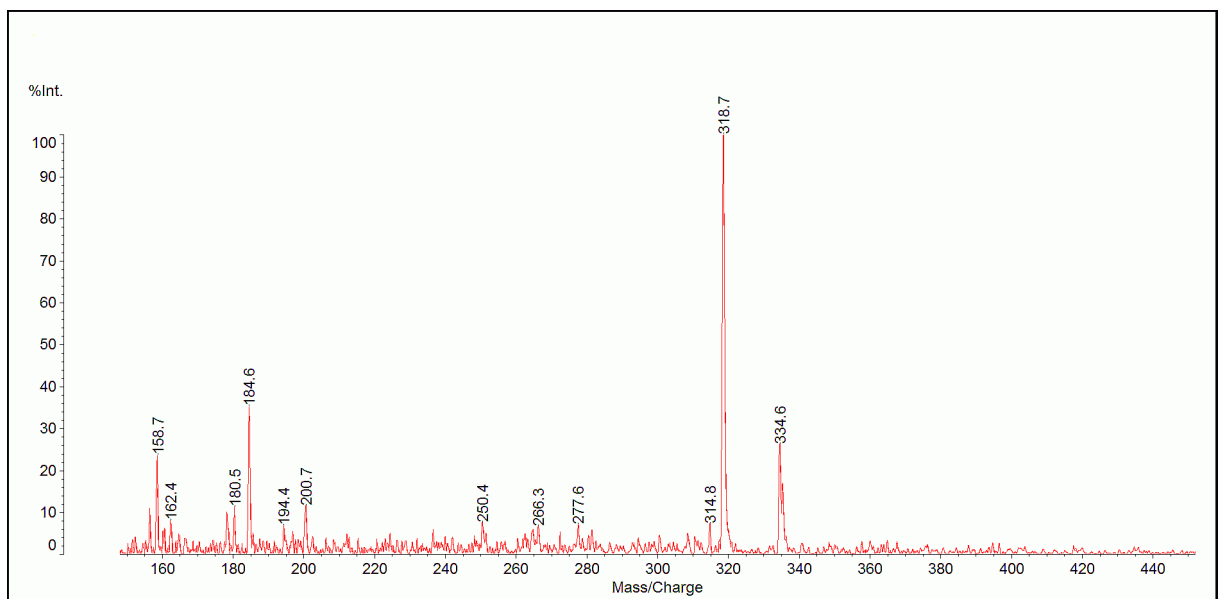


Abb. 36: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 11.5 und 13.5 mL im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates in Abb. 34. Identifizierte Molekülionen:  $m/z = 318.7$  [di-CM-Glucose]NaH<sup>+</sup>,  $m/z = 334.6$  [di-CM-Glucose]KH<sup>+</sup>.

Die chromatographische Trennung des BWL 3 Standardhydrolysates in Abb. 34 wurde analog analysiert. Bezüglich der Peaklagen stimmt das Chromatogramm mit dem von BWL 6 überein, mit der Ausnahme, dass keine tri-substituierte CM-Glucose detektiert wird. Dies ist wahrscheinlich eine Folge des geringeren Substitutionsgrades von BWL 3, der in einer geringeren Konzentration der tri-substituierten CM-Glucose resultiert, deren Konzentration damit unter der Nachweisgrenze des Chiralitätsdetektors liegt. Auch die weiteren Peakintensitäten des BWL 3 Standardhydrolysates unterscheiden sich von denen des BWL 6 Standardhydrolysates. Es fällt auf, dass der Glucosepeak in BWL 3 intensiver ist als in BWL 6. Der di-CM-Glucosepeak dagegen zeigt eine geringere Intensität. Diese Peakverhältnisse resultieren ebenfalls aus den unterschiedlichen mittleren chemischen Zusammensetzungen der Proben. Basierend auf den Chromatogrammen wurden die DS-Werte mithilfe der Gleichung 26 berechnet:

$$DS = \frac{F(\text{mono} - \text{CM} - \text{Gl}) + 2 \times F(\text{di} - \text{CM} - \text{Gl}) + 3 \times F(\text{tri} - \text{CM} - \text{Gl})}{F(\text{Gl}) + F(\text{mono} - \text{CM} - \text{Gl}) + F(\text{di} - \text{CM} - \text{Gl}) + F(\text{tri} - \text{CM} - \text{Gl})}$$

Gleichung 26

wobei F die Peakfläche der substituierten Glucosederivate darstellt. Der Berechnung liegt die Annahme zugrunde, dass die Responsefaktoren der unterschiedlichen Glucosen im Chiralitätsdetektor sich nicht unterscheiden.

Aus den Hydrolysaten wurden basierend auf Gleichung 26 die folgenden DS-Werte berechnet: DS (BWL 3) = 0.84, DS (BWL 6) = 1.23. Diese liegen 11 % (für BWL 3) bzw. 20 % (für BWL 6) unter den in Tab. 15 genannten Werten. Dies ist unter Umständen auf die unterschiedlichen Responsefaktoren der substituierten Glucosederivate zurückzuführen.

Wenn jetzt der Einsatz der dargestellten Methode zur DS-Bestimmung der Gradientenfraktionen abgeschätzt werden soll, dann wird deutlich, dass die relativ großen Fehler, mit denen die DS-Werte bestimmt werden, dazu führen könnten, dass besonders bei bezüglich DS engverteilten Proben Schwierigkeiten in der Berechnung der DS-Verteilungen auftreten könnten. Zusätzlich könnten Probleme mit verdünnten Gradientenfraktionen wegen der geringen Empfindlichkeit des Chiralitätsdetektors auftreten.

Daher sollte das Potential einer weiteren Methode zur DS-Bestimmung über den Gradientenpeak geprüft werden. Dazu wurden die nach der Standardhydrolyse gebildeten

CM-Glucosen auf einer polymerbasierten Kationenaustauschersäule (in Anlehnung an [28]) chromatographiert. Im vorliegenden Fall wurde jedoch anstatt der in der Literatur verwendeten Schwefelsäure verdünnte Perchlorsäure als Eluent verwendet. Der Grund dafür lag darin, dass die Perchlorsäure auch zur Hydrolyse der NaCMCn verwendet wurde und durch deren Verwendung als Elutionsmittel das Auftreten zusätzlicher Peaks minimiert bzw. verhindert werden könnte. Zur Optimierung der chromatographischen Trennung wurden drei unterschiedlichen Säurekonzentrationen (0.83, 4.15 und 8.31 mmol/L) bei jeweils zwei unterschiedlichen Säulentemperaturen (35 und 65 °C) getestet. Die besten Trennungen konnten dabei mit der geringsten Säurekonzentration von 0.83 mmol/L in Verbindung mit der höchsten Säulentemperatur von 65 °C erzielt werden. Flussratenveränderungen im Bereich zwischen 0.4 und 1 ml/min hatten keinen Einfluss auf die Trennung. Zur Detektion wurde der Einsatz dreier unterschiedlicher Detektoren getestet – eines RI-, UV- und Chiralitätsdetektors, um die bestmögliche Auflösung und damit die Auswertung der Chromatogramme zu erhalten. Da die Retention in der Ionenausschlusschromatographie mit steigender Ladung abnimmt, sollte sich hierbei eine gegenüber der Ionenaustauschchromatographie umgekehrte Elutionsreihenfolge ergeben.

Die Chromatogramme der Standardhydrolysate der Proben BWL 3, BWL 4 und BWL 6 sind in Abb. 37 dargestellt. In jedem Chromatogramm in Abb. 37 lassen sich bis zu fünf Peaks unterscheiden, die allerdings nicht basisliniengetrennt sind. Die Identifizierung der Peaks erfolgte nach Fraktionierung der Probe BWL 6 mittels der MALDI-TOF Massenspektrometrie (Spektren siehe Abb. 38 – Abb. 41). Peak 1 (fraktioniert zwischen 3.50 und 4.23 mL) enthält offensichtlich keine Glucosederivate, was aufgrund der fehlenden Peaks im MALDI-TOF Massenspektrum in Abb. 38 zwischen  $m/z = 180$  und 450 festgestellt werden konnte. Zudem findet sich dieser Peak auch im Chromatogramm (nicht gezeigt) einer Blank-Standardhydrolyse (analoge Reaktionsführung und Aufarbeitung wie bei der Standardhydrolyse, allerdings ohne Zusatz von CMC). Daher kann man schlussfolgern, dass Peak 1 mit hoher Wahrscheinlichkeit durch anorganische Salze wie KOH, NaOH,  $\text{KClO}_4$ ,  $\text{NaClO}_4$ , NaOAc und KOAc verursacht wurde. Dies ist im Einklang mit der Literatur [28]. Die restlichen Peaks konnten anhand der MALDI-TOF Massenspektren als Glucosederivate identifiziert werden, allerdings sind die erhaltenen Fraktionen nicht sauber getrennt, wie die MALDI-TOF Massenspektren zeigen. Die Fraktionen des Peaks 2 (fraktioniert zwischen 4.66 und 4.74 mL) und des Peaks 3 (fraktioniert zwischen 4.84 und 5.08 mL) enthalten sowohl tri-

als auch di- und mono-CM-Glucosen (Spektren siehe Abb. 39 und Abb. 40). In diesen Spektren werden die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Addukte der Na- und K-Salze der mono-CM-Glucosen, die NaH- und KH-Salze der di-CM-Glucosen sowie die NaHH- und KHH-Salze der tri-CM-Glucose detektiert. Auch hierbei treten somit wieder Strukturen auf, bei denen ein Teil der CM-Substituenten als Na(K)-Salz und der andere Teil der CM-Substituenten als Säure vorliegen. Nur das Spektrum der Fraktion des Peaks 4 (fraktioniert zwischen 5.18 und 5.48 mL) (Abb. 41) zeigt drei intensivsten Peaks, die den  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Addukten der Salze der mono-CM-Glucosen zugeordnet werden können, weswegen dieser Peak sauber als mono-CM-Glucose identifiziert werden konnte. Zusätzlich konnte der Peak 5 durch Injektion reiner Glucose als solche identifiziert werden.

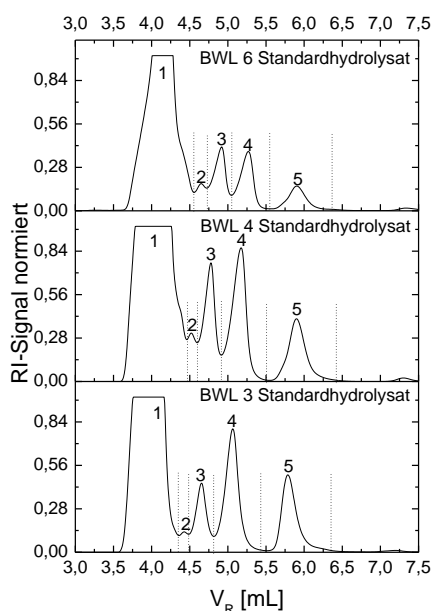


Abb. 37: Normierte Chromatogramme der Standardhydrolysate von BWL 3 (unten), BWL 4 (mitte) und BWL 6 (oben) mittels Ionenausschlusschromatographie. Injektionsvolumen 30  $\mu\text{L}$  (BWL 3), 40  $\mu\text{L}$  (BWL 4), 80  $\mu\text{L}$  (BWL 6). RI-Detektor. Die nominelle CMC-Konzentration betrug ca. 4.5 g/L. Die punktierten Linien zeigen die Peakgrenzen für die quantitative Auswertung.

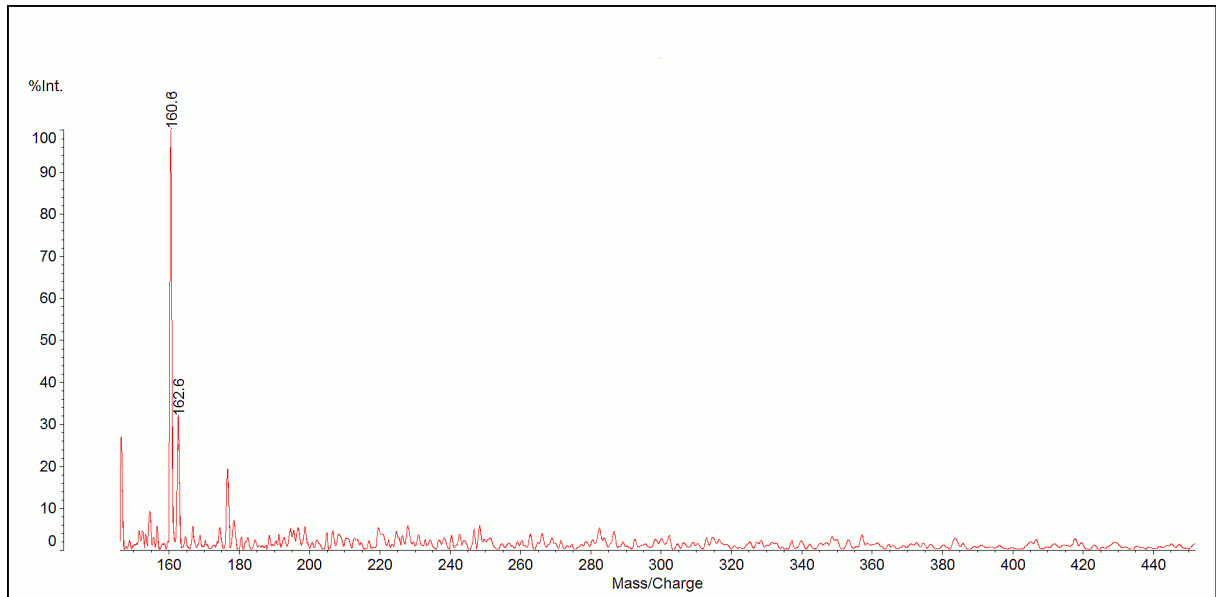


Abb. 38: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 3.50 und 4.23 mL (Peak 1) im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates in Abb. 37.

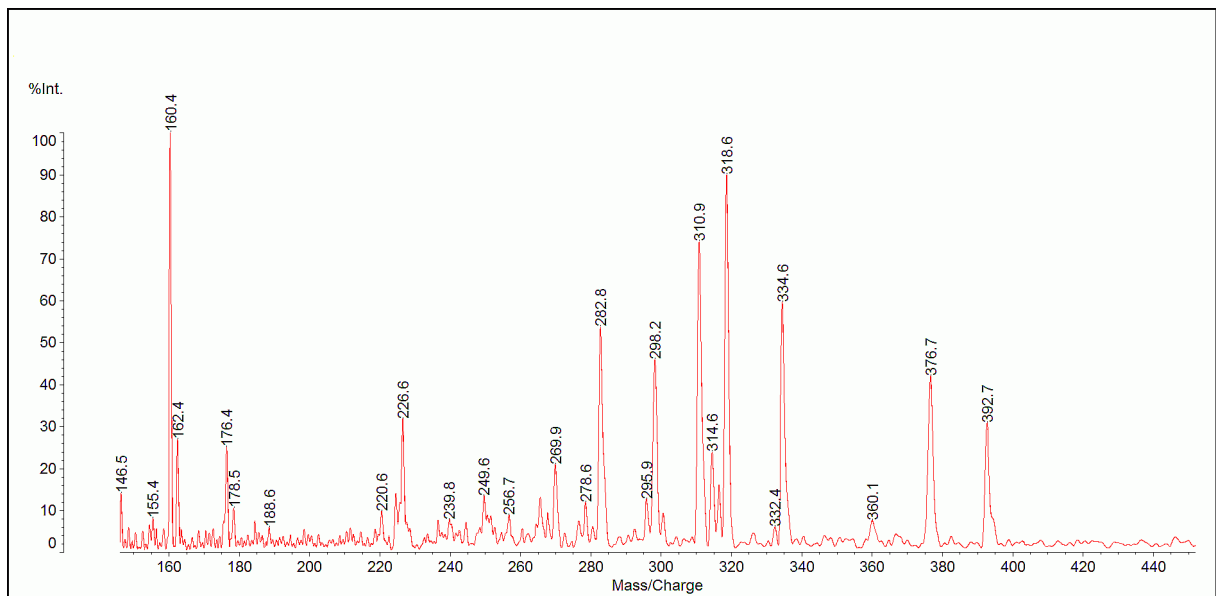


Abb. 39: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 4.66 und 4.74 mL (Peak 2) im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates in Abb. 37. Identifizierte Molekülonen:  $m/z = 282.8$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaNa}^+$ ,  $m/z = 298.2$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaK}^+$ ,  $m/z = 310.9$  eventuell [mono-CM-Glucose] $\text{KK}^+$ ,  $m/z = 314.6$  [mono-CM-Glucose] $\text{KK}^+$ ,  $m/z = 318.6$  [di-CM-Glucose] $\text{NaH}$ ,  $m/z = 334.6$  [di-CM-Glucose] $\text{KH}$ ,  $m/z = 376.7$  [tri-CM-Glucose] $\text{NaHH}$ ,  $m/z = 392.7$  [tri-CM-Glucose] $\text{KHH}$ .

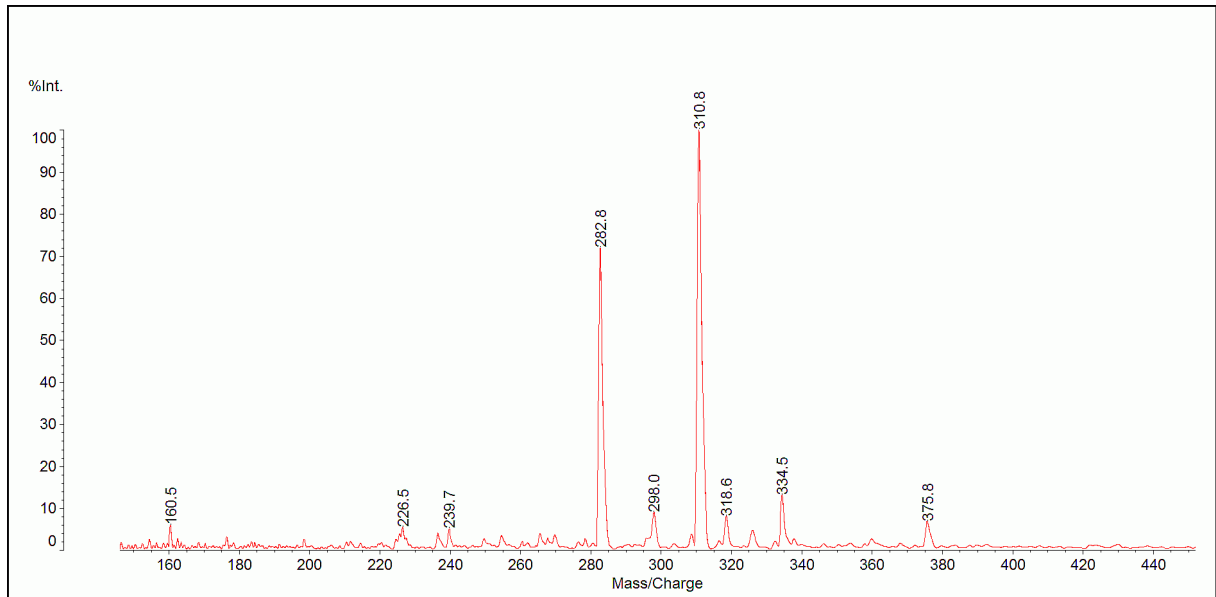


Abb. 40: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 4.84 und 5.08 mL (Peak 3) im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates in Abb. 37. Identifizierte Molekülonen:  $m/z = 282.8$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaNa}^+$ ,  $m/z = 298.0$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaK}^+$ ,  $m/z = 310.8$  eventuell [mono-CM-Glucose] $\text{KK}^+$ ,  $m/z = 318.6$  [di-CM-Glucose] $\text{NaH}$ ,  $m/z = 334.5$  [di-CM-Glucose] $\text{KH}$ ,  $m/z = 375.8$  [tri-CM-Glucose] $\text{NaHH}$ .

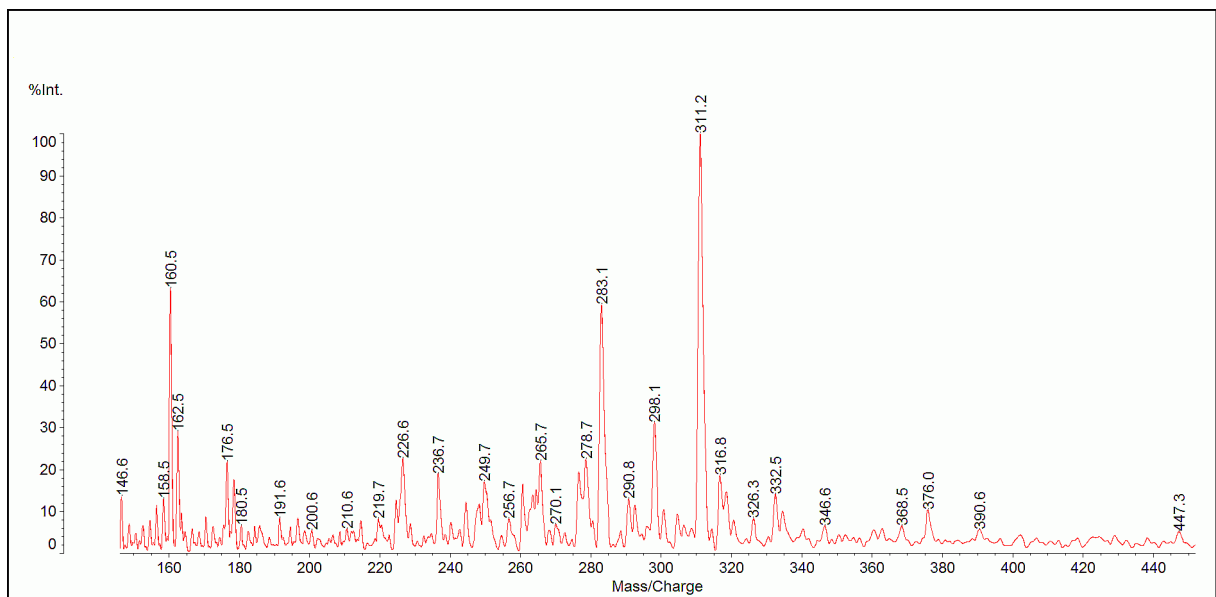


Abb. 41: MALDI-TOF Massenspektrum der Fraktion zwischen 5.18 und 5.48 mL (Peak 4) im Chromatogramm des BWL 6 Standardhydrolysates in Abb. 37. Identifizierte Molekülonen:  $m/z = 283.1$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaNa}^+$ ,  $m/z = 298.1$  [mono-CM-Glucose] $\text{NaK}^+$ ,  $m/z = 311.2$  eventuell [mono-CM-Glucose] $\text{KK}^+$ .

Da anhand der identifizierten Peaks 1, 4 und 5 nachgewiesen war, dass die Elutionsreihenfolge der substituierten Glucosen mit der Literatur übereinstimmt, kann angenommen werden, dass die Peaks 2 und 3 durch die tri- bzw. di-CM-Glucosen verursacht wurden.



Basierend auf den Chromatogrammen und deren Peakflächen wurden mittels Gleichung 26 die folgenden DS-Werte ermittelt:  $DS = 0.97$  (BWL 3),  $DS = 1.22$  (BWL 4) und  $DS = 1.35$  (BWL 6). Die Abweichungen von den Referenzwerten in Tab. 15 betragen  $+ 2.1 \%$  (BWL 3),  $- 2.4 \%$  (BWL 4) und  $- 12.9 \%$  (BWL 6) und sind wahrscheinlich auf die unvollständige Trennung und die unterschiedlichen Responsefaktoren der Glucosederivate zurückzuführen. Die Übereinstimmung bei den DS-Werten aus der Ionenausschlusschromatographie ist insgesamt jedoch deutlich besser als bei der Anionenaustauschchromatographie. Die Ionenausschlusschromatographie scheint daher zur Bestimmung der DS-Werte besser geeignet zu sein.

Zur Optimierung der Trennung in Abb. 37 wurden Versuche unternommen um die Auflösung der Peaks 1 und 2 (des Salzpeaks und des tri-CM-Glucosepeaks) zu verbessern. So wurde versucht die Intensität des Peaks 1 durch Verwendung eines UV- oder Chiralitätsdetektors zu minimieren, da die Salze nur eine geringe UV-Aktivität und keine optische Aktivität aufweisen sollten. Dadurch sollten die Salze die Bestimmung der Peakfläche von Peak 2 nur wenig beeinflussen. Die entsprechenden Chromatogramme für das BWL 3 Standardhydrolysat sind in Abb. 42 gezeigt.

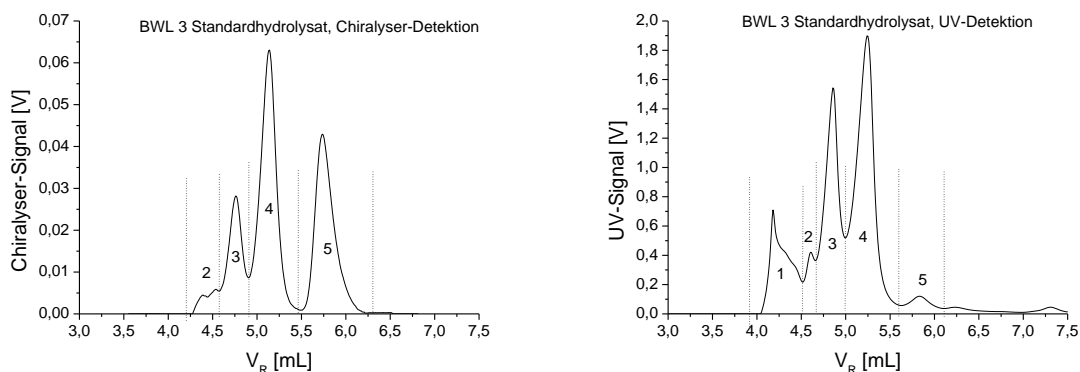


Abb. 42: Chromatographische Trennungen des BWL 3 Standardhydrolysates aus Abb. 37 bei Verwendung eines Chiralitätsdetektors (links) und eines UV-Detektors (rechts). Injektionsvolumen 100  $\mu$ L.

Die Abwesenheit von Peak 1 im Chromatogramm unter Verwendung des Chiralitätsdetektors zeigt, dass die Salze tatsächlich keinen Beitrag mehr zum Signal liefern und somit ausschließlich die Glucosederivate detektiert werden. Dies konnte auch durch Injektion eines CMC-freien Standardhydrolysates belegt werden. Allerdings errechnet sich aus dem Chromatogramm und Gleichung 26 für DS ein Wert von 0.74 für BWL 3, welcher somit ca.

22 % vom Referenzwert abweicht, was wahrscheinlich auf den Einfluss des Substitutionsgrades auf den Detektorresponse zurückgeführt werden kann. Somit lässt sich durch die Verwendung des Chiralitätsdetektors zwar die Überlagerung des Salzpeaks mit dem Peak der tri-substituierten Glucose umgehen, allerdings resultiert eine höhere Ungenauigkeit bei der Bestimmung der DS-Werte. Daher wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

In Abb. 42 rechts ist Chromatogramm gezeigt, bei welchem zur Detektion einen UV-Detektor bei 195 nm eingesetzt wurde. Auch hier wird die Intensität des Salzpeaks 1 im Vergleich zu Abb. 37 erheblich herabgesetzt, da die anorganischen Salze nur eine schwache UV-Absorption besitzen. Trotz der besseren Trennung der beiden Peaks ergeben sich verglichen mit Abb. 37 vollkommen andere Peakverhältnisse, was mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen ist, dass der Derivatisierungsgrad den UV-Response erheblich beeinflusst. Sehr deutlich wird das bei der Betrachtung von Peak 5 (reine Glucose), welcher eine sehr geringe Intensität besitzt, während die Peaks der substituierten Glucosen intensive Signale ergeben (Peaks 2, 3, 4). Offenbar wird der Response bei dieser Wellenlänge maßgeblich durch die CM-Substituenten bestimmt. Somit müssen für eine quantitative Auswertung der UV-Chromatogramme die Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen CM-Glucosen berücksichtigt werden. Da jedoch keine geeigneten Standardsubstanzen zur Bestimmung der absoluten Responsefaktoren zur Verfügung standen, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

Nach diesen Ergebnissen scheint die Ionenausschlusschromatographie unter Verwendung der RI-Detektion für eine potentielle Charakterisierung der Gradientenfractionen besser geeignet zu sein, als die anderen untersuchten Möglichkeiten, da diese Methode die geringsten Abweichungen der berechneten DS-Werte von den Referenzdaten liefert. Gegenüber der Anionenaustauschchromatographie liefert sie zusätzlich den Vorteil, dass aufgrund einer höheren Empfindlichkeit des RI- im Vergleich zum Chiralitätsdetektor kleinere Substanzmengen benötigt werden.

Daher wurde anschließend untersucht, ob die vorgesehene Bausteinanalyse auch für die Charakterisierung der Gradientenfractionen geeignet ist, da zum einen die Polymerfraktion nach der Gradientenchromatographie nur in sehr geringen Mengen, sehr verdünnt und zudem in einer H<sub>2</sub>O/Methanol Ammoniumacetatpuffer-Lösung vorliegen.

### Versuche zur Übertragung der aufgebauten HPLC-Methode nach vollständigem Kettenabbau auf die Gradientenfractionen

Für eine Charakterisierung der chromatographischen Fraktionen sollte im Idealfall die beschriebene Standardhydrolyse mit der anschließenden chromatographischen Trennung der Glucosederivate direkt auf die gelösten Polymerfraktionen anwendbar sein. Um dies zu überprüfen wurde eine der Gradientenfraction ähnliche Polymerlösung simuliert. Hierzu wurde BWL 3 bei einer Konzentration von 0.2 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}/\text{Methanol} = 87/13$  mit 100 mmol/L Ammoniumacetat und 446 mmol/L Essigsäure gelöst. Zur Hydrolyse wurde zu 1 mL dieser Polymerlösung (dies entspricht etwa dem Volumen einer Gradientenfraction) 0.1 mL 70%-tiger Perchlorsäure zugegeben. Somit entspricht die Säurekonzentration in der Reaktionsmischung der Säurekonzentration am Ende der Standardhydrolyse. Da die Säurekonzentration konstant gehalten wurde, die Polymerlösung jedoch stark verdünnt vorliegt, ist das Mengenverhältnis von Säure zu Polymer ca. 25 Mal höher als bei der Standardhydrolyse. Analog zur Standardhydrolyse wurde die Mischung 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 1 h bei 120°C gerührt. Dabei beobachtete man zunächst eine Dunkelfärbung der Reaktionslösung, die mit der Zeit schwarz wurde. Der schwarze Niederschlag wurde abfiltriert, das gelbliche Filtrat neutralisiert, etwas eingeeengt, filtriert und auf der Kationenaustauschersäule unter den oben beschriebenen Bedingungen mit RI-Detektion vermessen. Das Chromatogramm ist in Abb. 43 wiedergegeben.<sup>Fußnote 1</sup>

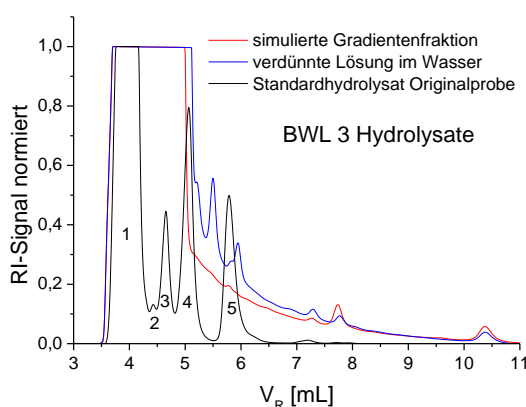


Abb. 43: Überlagerung der Chromatogramme von BWL 3 Hydrolysaten: Hydrolysat mit simulierter Gradientenfraction (rot, die nominelle CMC-Konzentration ca. 0.18 g/L, Injektionsvolumen 100  $\mu\text{L}$ ), Hydrolyse mit verdünnter Polymerlösung im Wasser (blau, nominelle CMC-Konzentration ca. 0.18 g/L, Injektionsvolumen 100  $\mu\text{L}$ ), Standardhydrolyse mit Originalprobe (schwarz, nominelle CMC-Konzentration ca. 4.5 g/L, Injektionsvolumen 30  $\mu\text{L}$ ).

Im Chromatogramm dieses Hydrolysates wird an der Stelle des ursprünglichen Salzpeaks (Peak 1) ein sehr intensiver und breiter Peak detektiert, der mit den Peaks der eventuell gebildeten CM-Glucosen (Peaks 2, 3, 4) überlagert. Dieser Peak kommt eventuell dadurch zustande, dass zusätzlich zu den schon erwähnten anorganischen Salzen noch das Salz des Puffers in der Lösung anwesend ist, und zudem ein erheblich höheres Säure/Polymer-Verhältnis als bei der Standardhydrolyse eingesetzt wurde. Die Abwesenheit des reinen Glucosepeaks 5 könnte darauf hindeuten, dass die Gesamtintensität zu gering ist, da die Menge des zur Hydrolyse eingesetzten Polymers erheblich geringer ist als beim Hydrolysat der Standardhydrolyse der Originalproben.

Zudem kann die Anwesenheit des Puffers und/oder des Methanols bei der Hydrolyse dazu führen, dass diese nicht vollständig oder anders verläuft als beim Standardverfahren. In den Elutionsbereichen 7 – 8 mL und 10 – 11 mL werden zusätzlich noch Peaks detektiert, die im Chromatogramm des Standardhydrolysates der Originalprobe (schwarz) kaum detektierbar sind und deshalb bis jetzt außer Acht gelassen wurden. Dabei könnte es sich um die in der Literatur beschriebenen [28], in einer Nebenreaktion gebildeten O-CM-Gluconolactone handeln.

Im Weiteren wurde versucht systematisch herauszufinden welche der o. g. Effekte für die genannten Probleme entscheidend sind und wie ihnen eventuell begegnet werden kann. Hierzu wurde zunächst eine verdünnte BWL 3-Lösung analog zur simulierten Gradientenfraction jedoch ohne Puffer und Methanol hydrolysiert. Dies sollte darüber Auskunft geben, ob der Puffer/Methanolzusatz die Ursache der Probleme ist. Es wurde bei Abwesenheit des Puffers und Methanols keine Dunkelfärbung beobachtet. Nach Neutralisation und Filtration wurde die Probe anschließend chromatographisch untersucht. Das Chromatogramm ist ebenfalls in Abb. 43 (blau) dargestellt. Analog zur simulierten Gradientenfraction erkennt man den intensiven und breiten Peak im Elutionsbereich 3.5 – 5 mL, der somit offenbar aus dem großen Säure/Polymer-Verhältnis resultiert. Im Bereich zwischen 5.2 und 6.5 mL sind zwei weitere Peaks zu erkennen, die auf die gebildeten

Fußnote 1: An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass bei allen nachfolgenden Versuchen nicht auf die Exaktheit der Einengung der neutralisierten Reaktionslösungen geachtet wurde, was dazu führen kann, dass sich die Konzentrationen der gebildeten Glucosen und Salze in den gezeigten Chromatogramme unterscheiden, wodurch unterschiedlichen Gesamtintensitäten resultieren. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf die quantitative Auswertung der Chromatogramme, da hierbei nur die Relation der Peaks zueinander von Bedeutung ist. Nur bei extrem geringen Gesamtintensitäten, bei denen die Peaks aufgrund eines sehr geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht mehr erkannt werden können, können Probleme bei der quantitativen Auswertung auftreten.

mono-substituierten bzw. die reine Glucose hindeuten könnten (Peak 4 und 5). Allerdings sind sie gegenüber dem Standardhydrolysat deutlich zu größeren Elutionsvolumen verschoben. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um die Zuckermoleküle bzw. optisch aktive Stoffe handelt, wurde die Trennung erneut, jedoch unter Verwendung des Chiralitätsdetektors wiederholt. Ein Vergleich der Chromatogramme der im Wasser hydrolysierten verdünnten Polymerlösung unter Verwendung beider Detektionsmethoden ist in Abb. 44 zu sehen.

Die Elutionsvolumen der Peaks 4 und 5 unter Verwendung der beiden Detektoren stimmen überein, was darauf hindeutet, dass es sich dabei höchstwahrscheinlich um die optisch aktiven Glucosederivate – mono-substituierte sowie reine Glucose – handelt.

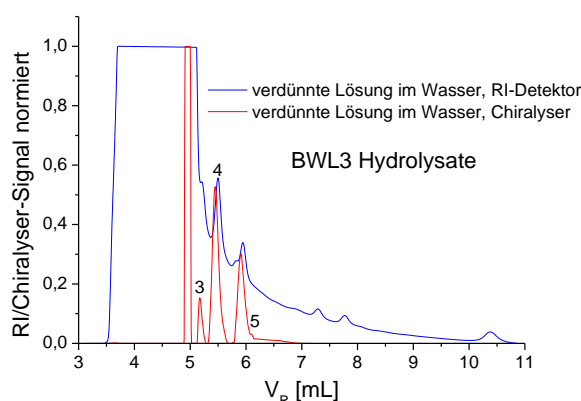


Abb. 44: Überlagerung der normierten Chromatogramme der BWL 3 Hydrolysate in verdünnter wässriger Polymerlösung unter Verwendung des RI-Detektors bei 35 °C (blau) und des Chiralitätsdetektors (rot). Injektionsvolumen 100 µL.

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die Menge des zur Hydrolyse eingesetzten Polymers (0.2 mg) zur RI-Detektion ausreicht, wenn die Hydrolyse ohne Puffer/Methanolzusatz durchgeführt wird. Somit ist anzunehmen, dass der Puffer- und/oder Methanolzusatz einen negativen Einfluss auf die Hydrolyse ausübt. Daher wurde versucht den Puffer und das Methanol vor der Hydrolyse zu entfernen. Hierzu wurde eine Gradientenfraction simuliert, die nach einer 30 x fachen Fraktionierung entstehen würde, was etwa 6 mg des Polymeren entspricht. Diese Menge ergibt sich in einer Gradientenfraction, wenn 30 Mal jeweils 10 x 100 µL einer 1 g/L-Lösung der Originalprobe in die Gradientensäule injiziert wird (zur zehnfachen Injektion siehe Kapitel 4.4) und anschließend das Eluat in 5 Fraktionen aufgeteilt wird. Die simulierte Gradientenfraction wurde dann 1 h bei 100°C auf einer Heizplatte thermisch behandelt. Dabei sollten Essigsäure, Methanol und Wasser verdampfen. Da

weiterhin Ammoniumacetat sich thermisch (ab 90 °C) in Ammoniak und Essigsäure zersetzt, sollte es sich somit auch entfernen lassen. Mit dem verbliebenen Feststoff wurde anschließend die Standardhydrolyse analog der Originalprobe durchgeführt, wobei die zugesetzte Säuremenge der vorhandenen Polymermenge angepasst wurde. Dazu wurden 0.12 mL 70%-tiger Perchlorsäure zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur gerührt, danach 1.20 mL Wasser zugegeben und 1 h bei 120°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend neutralisiert, eingengt<sup>Fußnote 1</sup>, filtriert und chromatographisch getrennt (siehe Abb. 45).

Im Chromatogramm der simulierten Fraktion in Abb. 45 werden die Glucosederivate detektiert (Peaks 3, 4, 5). Offenbar konnte durch die thermische Behandlung der Lösung vor der Hydrolyse die Intensität des Salzpeaks 1 relativ zu den Glucosepeaks erheblich reduziert werden, da im Vergleich zu Abb. 43 der Salzpeak jetzt nur mit dem tri-CM-Glucosepeak 2 überlagert. Die unterschiedlichen Gesamtintensitäten könnten durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Glucosederivate in den injizierten Lösungen verursacht sein, da nicht auf eine exakte Einengung der Reaktionslösungen geachtet wurde.<sup>Fußnote 1</sup>

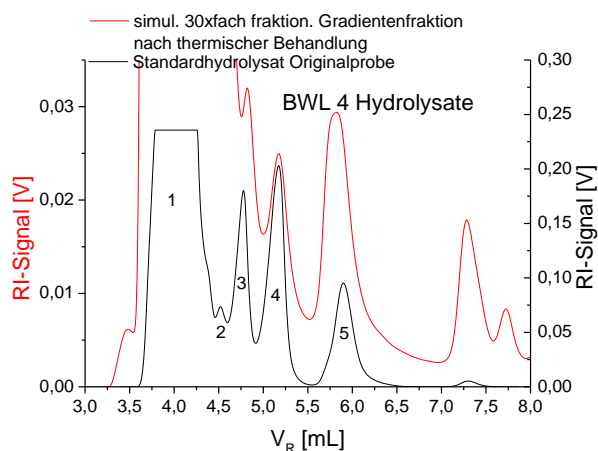


Abb. 45: Chromatogramme von BWL 4 nach Hydrolyse: Standardhydrolyse Originalprobe (schwarz), simulierte 30 x fach fraktionierte Gradientenfraktion nach thermischer Behandlung (rot). Bei der Originalprobe betrug die nominelle CMC-Konzentration ca. 4.5 g/L, bei der Fraktion ist diese unbekannt (siehe Fußnote 1). Injektionsvolumen 40 µL (Originalprobe), 100 µL (Gradientenfraktion).

Beim Vergleich der Chromatogramme fällt jedoch auf, dass sich die Intensitätsverhältnisse der gebildeten Glucosen unterscheiden. So ist z.B. der Glucosepeak 5 gegenüber dem mono-Glucosenpeak 4 im Hydrolysat der simulierten Fraktion intensiver als im Hydrolysat der Standardhydrolyse. Mögliche Ursachen für den abweichenden Ablauf der Hydrolyse könnten darin liegen, dass die relativ lange und bei hoher Temperatur durchgeführte Behandlung zu Veränderungen des Polymeren, wie z.B. eine partielle Oxidation, geführt haben. Es könnte

auch sein, dass der Puffer nach 1 h noch nicht vollständig eingedampft ist und somit dem „normalen“ Ablauf der Hydrolyse stört, jedoch weniger die nachgeschaltete Chromatographie beeinflusst.

Anhand der Ergebnisse kann gefolgert werden, dass der Verlauf der Hydrolyse durch die Anwesenheit des Puffers gestört wird. Durch die Entfernung des Puffers vor der Hydrolyse durch die thermische Behandlung konnte zwar die Hydrolyse erfolgreich durchgeführt und der Störpeak 1 erheblich reduziert werden. Allerdings ergeben sich Veränderungen der Intensitätsverhältnisse im Chromatogramm verglichen mit der Standardhydrolyse, welche schließlich in einer fehlerhaften Bestimmung der DS-Werte resultieren würden.

Somit sollte der Puffer aus den Fraktionen auf eine andere Weise vor der Hydrolyse entfernt werden. Am problematischsten scheint dabei die Entfernung des Ammoniumacetats zu sein, da Essigsäure und Methanol einfach durch Abdampfen (auch ohne thermische Behandlung) entfernt werden können. Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Entfernung des Ammoniumacetates durch eine Dialyse der Polymerfraktionen gegen Wasser. Auch mittels SEC in reinem Wasser als Eluent könnte die hochmolekulare Polymerfraktion von Salz befreit werden, da das Polymermaterial aufgrund eines viel höheren hydrodynamischen Volumens früher als die niedermolekularen Salze eluieren sollte. Die beiden Vorgehensweisen sind jedoch mit erheblichem Zeitaufwand behaftet und müssten für jede Fraktion durchgeführt werden.

Deshalb wurde nach den alternativen Methoden gesucht um eine Trennung nach DS über die Peaks der Gradientenchromatographie zu belegen. Wie schon erwähnt, ist die FTIR-Spektroskopie eine empfindliche Methode und kann mithilfe eines speziellen Interfaces mit der Chromatographie gekoppelt werden. Sie wurde bereits zur Charakterisierung chemischer Heterogenität anderer Polymere erfolgreich eingesetzt und sollte daher auch im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet werden.

#### **4.3.2 Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie**

Die FTIR-Spektroskopie stellt, wie es im theoretischen Teil beschrieben wurde, eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung sowohl der Bruttozusammensetzung von Polymeren als auch der chemischen Zusammensetzung getrennter chromatographischer

Fractionen dar. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit geprüft, ob sie auch zur Charakterisierung der Gradientenfractionen von NaCMCn eingesetzt werden kann.

Noch bevor die eigentliche Charakterisierung der Gradientenfractionen mittels LC-FTIR-Kopplung durchgeführt wurde, wurden ATR-FTIR-Spektren der Originalproben verschiedener DS-Werte aufgenommen und analysiert. Damit konnte eine schnelle Abschätzung über das Potential der FTIR-Spektroskopie zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung von NaCMCn gewonnen werden.

In Abb. 46 ist das ATR-FTIR-Spektrum einer NaCMC-Probe dargestellt. Im Spektrum in Abb. 46 werden die folgenden Banden, die durch die angegebenen Schwingungstypen hervorgerufen werden, detektiert: bei  $3300\text{ cm}^{-1}$  OH-Valenzschwingung unsubstituierter Hydroxylgruppen in H-Brücken, bei  $2900\text{ cm}^{-1}$  CH-Valenzschwingung, bei  $1589\text{ cm}^{-1}$  (Carbonylbande) COO-asymmetrische Valenzschwingung von CM-Substituenten, bei  $1414\text{ cm}^{-1}$  COO-symmetrische Valenzschwingung von CM-Substituenten und bei  $1052\text{ cm}^{-1}$  CO-Skelettschwingung.

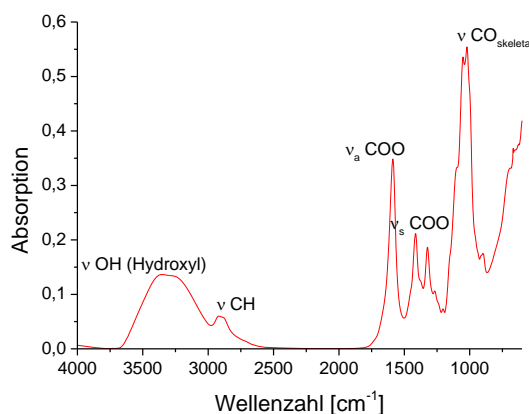


Abb. 46: ATR-FTIR-Spektrum von Avicel 3.

Die Höhe der Carbonylbande bei  $1589\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1589}$ ) sollte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zum Anteil der Carbonylbindungen und folglich zum Anteil der CM-Substituenten in dieser NaCMC-Probe sein. Gleichzeitig sollte die Höhe der Bande bei  $1052\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1052}$ ) den Anteil der AGUs widerspiegeln. Somit sollte das Verhältnis der Bandenhöhen bei den genannten Wellenzahlen ( $H_{1589}/H_{1052}$ ) proportional zum DS der Probe sein. Unter der Annahme, dass die Eindringtiefe bei den beiden Wellenzahlen gleich groß ist, sollte das gewählte Bandenhöhenverhältnis annähernd unabhängig von der Eindringtiefe der



FTIR-Strahlung in die Probe sein. Um zu überprüfen, ob das genannte Bandenhöhenverhältnis mit DS korreliert, wurden diese Werte für Avicel und BWLs bestimmt und in Abb. 47 als Funktion ihrer DS-Werte aufgetragen.

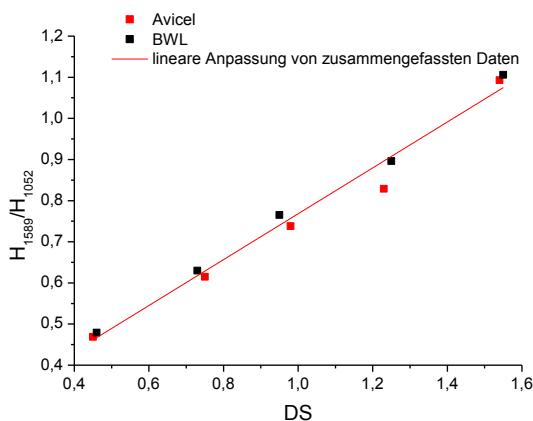


Abb. 47: Bandenhöhenverhältnis  $H_{1589}/H_{1052}$  (Basislinien entsprechend 1801-1494  $\text{cm}^{-1}$  und 1189-916  $\text{cm}^{-1}$ ) im ATR-FTIR-Spektrum als Funktion des DS-Wertes jeweils für BWL (schwarz) und Avicel (rot). Die Gerade resultierte aus einer gemeinsamen linearen Regression aller Datenpunkte.

Das Bandenhöhenverhältnis steigt, wie erwartet, für die beiden Probensets mit DS an. Weiterhin liegen auch die Datenpunkte für die beiden Probenerserien dicht beieinander, was auf einen geringen und vernachlässigbaren Einfluss des Molekulargewichtes auf die dargestellten Abhängigkeiten hindeutet. Die geringe systematische Abweichung kann eventuell auf zusätzlich zur Absorption auftretende Effekte wie Streuung oder Brechung zurückgeführt werden. Außerdem könnte sich entgegen der Annahme die Eindringtiefe bei den beiden Wellenlängen unterscheiden, weswegen sie sich aus dem Bandenhöhenverhältnis nicht mehr verkürzt. Wenn die Eindringtiefen zusätzlich von Probe zur Probe (von DS zum DS) variieren, kann das die beobachteten Abweichungen hervorrufen. Schließlich kann auch das Verhalten der Absorptionskoeffizienten leicht von DS abhängig sein. Da jedoch die Abweichungen gering sind, wurde eine gemeinsame lineare Regression aller Datenpunkte in Abb. 47 durchgeführt, woraus der folgende Zusammenhang ermittelt wurde:

$$H_{1589}/F_{1052} = 0.2104 + 0.5578 \cdot \text{DS}$$

$H_{1589}/H_{1052}$  – Bandenhöhenverhältnis: Höhe der Carbonylbande bei 1589  $\text{cm}^{-1}$  (Basislinie 1801-1494  $\text{cm}^{-1}$ ) geteilt durch die Höhe der CO-Bande bei 1052  $\text{cm}^{-1}$  (Basislinie: 1189-916  $\text{cm}^{-1}$ ).

Dieser Zusammenhang kann verwendet werden, um den DS-Wert einer unbekannten Probe zu ermitteln. Zusätzlich wird durch diese Untersuchungen klar, dass die FTIR-Spektroskopie durchaus Potential hat um die chemische Zusammensetzung der NaCMCn zu charakterisieren. Auf ähnliche Art und Weise sollten die chemischen Zusammensetzungen getrennter Gradientenfraktionen der NaCMCn charakterisiert werden, wobei die FTIR-Spektroskopie mit der Gradientenchromatographie mithilfe eines LC Transform Interfaces (siehe theoretischer Teil) gekoppelt wurde.

Für diese Untersuchungen wurden die technischen Proben (siehe Tab. 15) verwendet, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen die Modellproben Avicel und BWL noch nicht zur Verfügung standen. Da kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den technischen Proben und den Modellproben besteht und somit keine anderen Ergebnisse zu erwarten waren, wurde auf eine spätere Überprüfung der durchgeführten Versuche mit den Modellpolymeren verzichtet.

Mithilfe des LC Transform Interfaces wurde das Eluat der Abb. 32 im Elutionsbereich zwischen 7 und 14 mL auf die Germaniumplatte der LC Transform Vorrichtung gesprüht, wobei Polymerspuren, die bestimmten Elutionszeiten in der Gradientenchromatographie entsprechen, erhalten wurden. Allerdings wurde dabei bedingt durch die Anwesenheit des schwersiedenden Wassers im Eluenten die Flussrate der mobilen Phase auf 0.2 mL/min reduziert um deren gute Verdampfung in der LC Transform Vorrichtung zu gewährleisten. Danach wurden die lösungsmittelfreien FTIR-Spektren der erzeugten Polymerspuren aufgenommen. Für jede Probe wurde jeweils eine Spektrenserie erhalten, die zur Auswertung herangezogen wurde. Zunächst wurden für jede Probe die Chemigramme rekonstruiert, die die über das gesamte Spektrum integrierte Intensität als Funktion der Elutionszeit darstellen (siehe Abb. 48). Anhand des Chemigrammes kann überprüft werden ob oder in wie weit die chromatographische Trennung nach dem Aufsprühen auf die Germaniumplatte erhalten blieb.

Die Chemigramme spiegeln unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Flussraten ziemlich genau die Konzentrationsprofile der Chromatogramme in Abb. 32 wieder. Die Unterschiede in den Peaklagen und Intensitäten können auf die unterschiedlichen Totvolumina der beiden Detektoren und die unterschiedlichen Detektionsmethoden zurückgeführt werden. Dennoch ist zu erkennen, dass die Probenseparation der Proben nach dem Sprühen erhalten blieb.

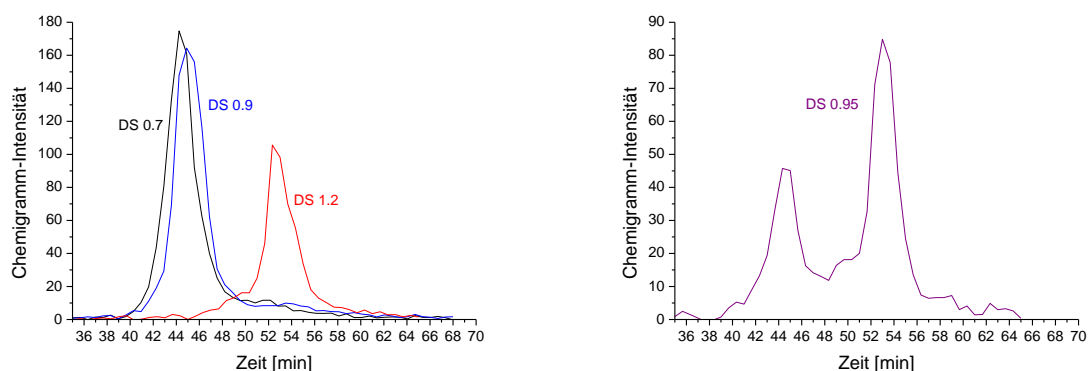


Abb. 48: FTIR-Chemigramme der Gradiententrennungen aus Abb. 32 im Elutionsbereich 7 mL (35 min) - 14 mL (70 min). Links: Rad 79 (schwarz), Rad 62 (blau), Rad 80 (rot), rechts: Probenmischung Rad 79 + Rad 80 (w/w = 1/1). Injektionsvolumen 50  $\mu$ L.

Eines der erhaltenen lösemittelfreien Spektren einer chromatographischen Fraktion ist in Abb. 49 exemplarisch dargestellt. Das Spektrum zeigt im Vergleich zum Spektrum der Originalprobe aus Abb. 46 einige deutliche Unterschiede vor allem in der Spektralregion zwischen 2980 und 3600  $\text{cm}^{-1}$ , wo typischerweise O-H-, N-H- und C-H-Schwingungen detektiert werden. Weitere Unterschiede finden sich im Carbonylbereich (1580 – 1750  $\text{cm}^{-1}$ ). Die Unterschiede in den Spektren können damit erklärt werden, dass während der chromatographischen Trennung ein Gegenionenaustausch an den Polymerketten stattfindet, wodurch Natriumacetat frei wird (siehe Kapitel 4.2) und die CMCn schließlich als Ammoniumsalze vorliegen, wodurch die NH-Valenzschwingungsbanden (bei 3210  $\text{cm}^{-1}$ ) verursacht werden.

Außerdem werden im Gegensatz zur Originalprobe im Spektrum der Fraktion zwei Carbonylbanden detektiert: eine für die asymmetrische COO-Valenzschwingung des Salzes bei 1578  $\text{cm}^{-1}$  und die andere für dieselbe Schwingungsart der Säuregruppen bei 1715  $\text{cm}^{-1}$ . Die Säuregruppen entstehen in einer Gleichgewichtsprotolyse aus den Carboxylatgruppen der CMC, wobei in der verwendeten sauren mobilen Phase das Gleichgewicht mehr auf die Säureseite verschoben ist. Die Säuregruppen verursachen außerdem die O-H-Valenzschwingungen bei 3060  $\text{cm}^{-1}$ . Schließlich können die unterschiedlichen Bandenintensitätsverhältnisse in den beiden Spektren auf die unterschiedlichen Aufnahmetechniken (in Abb. 46 – ATR und in Abb. 49 – Transmission) zurückgeführt werden.

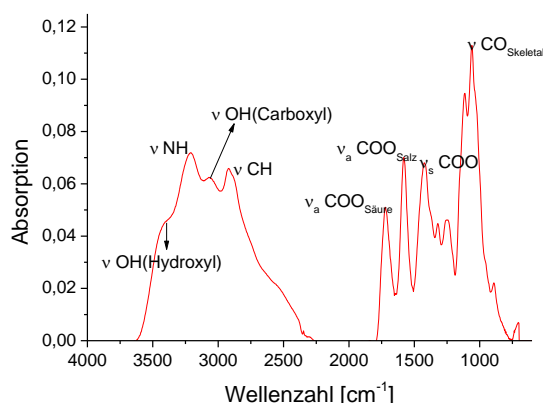


Abb. 49: FTIR-Spektrum einer chromatographischen Fraktion aus Abb. 48 zwischen 35 und 70 min.

### *Erstellung einer Kalibrierkurve zur Bestimmung von DS*

Um die DS-Werte der Fraktionen basierend auf den FTIR-Spektren zu bestimmen ist eine Kalibrierkurve notwendig, die mit geeigneten Kalibrierstandards erstellt werden sollte. Die Abhängigkeit in Abb. 47 als Kalibrierkurve ist in diesem Fall ungeeignet, da diese basierend auf den Spektren der nicht im Gradienten getrennten Proben erstellt wurde (Abb. 46), die deutliche Unterschiede zu den FTIR-Spektren der getrennten Fraktionen (Abb. 49) aufweisen. Daher muss die notwendige Kalibrierkurve mit Proben aufgenommen werden, die vor der Spektrenaufnahme ähnlich wie die Fraktionen behandelt wurden. Mit anderen Worten sie sollten mit der bei der Gradientenchromatographie verwendeten mobilen Phase im Kontakt gewesen sein. Eine Möglichkeit derartige Spektren zu erhalten wäre es, wenn die Proben in einer mobilen Phase, welche in etwa der Eluentenzusammensetzung am Peakmaximum des Gradientenchromatogramms entspricht (also in einer Mischung aus Wasser und Methanol mit Puffer bei pH = 4.1), gelöst und so ohne Säule auf die Germaniumplatte gesprüht werden. Wie erwartet, findet während der Gradiententrennung in pufferhaltigen mobilen Phasen ein Gegenionenaustausch an den Polymerketten statt, wobei Natriumacetat frei wird. Dieses wird höchstwahrscheinlich auch beim Lösen von NaCMCn in dem der mobilen Phase entsprechenden Lösungsmittel gebildet und kann die FTIR-Auswertung verfälschen, da ohne Säule keine Separation des Natriumacetates von der CMC stattfindet. Um das Problem zu umgehen, sollte das eventuell gebildete Natriumacetat vor der Spektrenaufnahme aus der Probenlösung entfernt werden. Dies wurde chromatographisch realisiert, indem auf der zur Gradiententrennung verwendeten stationären Phase (Luna PFP (2)) ein Stufengradient bei zwei unterschiedlichen isokratischen Eluentenzusammensetzungen durchgeführt wurde. Der

Stufengradient wurde mit einer Eluentenzusammensetzung von  $\text{H}_2\text{O}/\text{Methanol} = 95/5$  (im Wasser Ammoniumacetatpuffer,  $\text{pH} = 4.1$ ) begonnen, bei der, wie aus den Gradientenexperimenten bekannt ist, Natriumacetat ohne Wechselwirkungen am Totvolumen eluiert und die CMCn auf der Säule zurückgehalten werden. Zur Elution der CMCn wurde nach 3 min die Eluentenzusammensetzung in der mobilen Phase sprunghaft auf  $\text{H}_2\text{O}/\text{Methanol} = 70/30$  (im Wasser Ammoniumacetatpuffer,  $\text{pH} = 4.1$ ) geändert. Diese Eluentenzusammensetzung entspricht bei der gewählten stationären Phase einem starken Eluenten für alle NaCMC-Proben. Alle Wechselwirkungen der CMCn mit der Säule werden dadurch unterdrückt und die Proben eluieren in einem engen Elutionsbereich (etwa innerhalb von 0.5 mL) unabhängig von ihrem DS. Die Chromatogramme sind in Abb. 50 wiedergegeben.

Mithilfe des LC Transform Interfaces wurde das Eluat im Bereich der CMC-Elution (7.2 – 8.2 mL) auf die Germaniumplatte gesprüht, wodurch lösungsmittelfreie FTIR-Spektren der CMCn unter bezüglich pH und Salzkonzentration ähnlichen Bedingungen wie während der Gradiententrennungen erhalten werden. Die über den Elutionsbereich der Proben gemittelten FTIR-Spektren sind in Abb. 51 dargestellt.

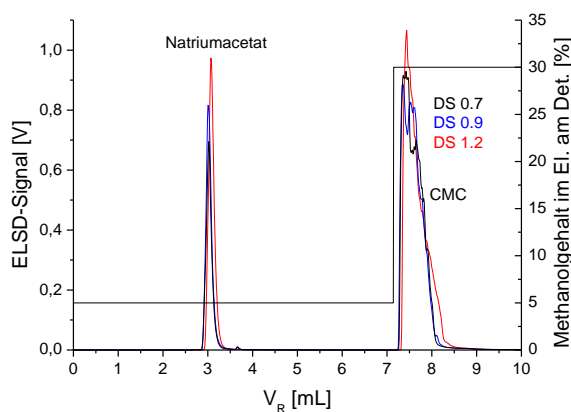


Abb. 50: Chromatogramme der Proben Rad 79 (schwarz), Rad 62 (blau), Rad 80 (rot) im Stufengradienten zur Aufnahme der FTIR-Kalibrationskurve. Injektionsvolumen 100  $\mu\text{L}$ . Probenkonzentration 1.25 g/L. Die schwarze Linie gibt den Methanolgehalt im Eluenten am Detektor an.

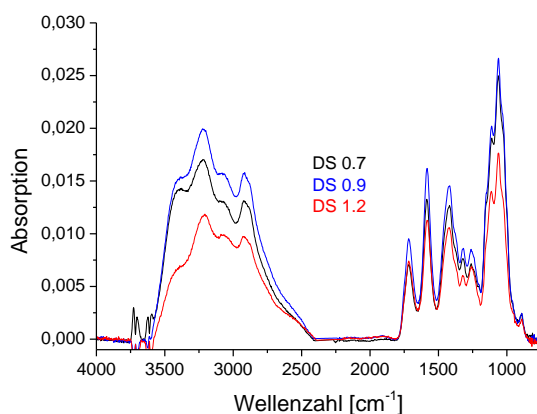


Abb. 51: Überlagerung der FTIR-Spektren von Rad 79 (schwarz), Rad 62 (blau) und Rad 80 (rot) zwischen 7.2 und 8.2 mL in Abb. 50. Injektionsvolumen 10  $\mu$ L.

Die Bandenlagen in diesen Spektren (insbesondere im Carbonylbereich) stimmen ziemlich genau mit dem Spektrum der im Gradienten getrennten Fraktion in Abb. 49 überein. Somit können diese Spektren zur Erstellung der Kalibrierkurve verwendet werden.

Für die Kalibration wurden die Bandenhöhen bei  $1715\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1715}$ , hervorgerufen durch die asymmetrischen COO-Valenzschwingungen der Säuregruppen), bei  $1578\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1578}$ , asymmetrische COO-Valenzschwingungen des Salzes) und bei  $1423\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1423}$ , symmetrische COO-Valenzschwingungen), sowie die Summen der Bandenhöhen der beiden asymmetrischen COO-Valenzschwingungen bei  $1715\text{ cm}^{-1}$  und  $1578\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1715} + H_{1578}$ ) jeweils auf die Bandenhöhe bei  $1059\text{ cm}^{-1}$  ( $H_{1059}$ , hervorgerufen durch die CO-Skelettschwingung) normiert und gegen den DS-Wert der Probe aufgetragen um die beste Korrelation zu identifizieren. Neben den Bandenhöhenverhältnissen wurden auch die Bandenflächenverhältnisse  $F$  der genannten Banden ( $F_{1808-1650}/F_{1190-916}$ ,  $F_{1650-1508}/F_{1190-916}$ ,  $F_{1508-1344}/F_{1190-916}$  und  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$ , die Zahlenangaben stehen für Wellenzahlbereiche, die als Peakgrenzen verwendet wurden) gebildet und gegen die DS-Werte der jeweiligen Proben aufgetragen. Obwohl eine auf nur drei Messpunkten basierende Kalibration (bei den industriellen Proben standen nur drei unterschiedliche DS-Werte zur Verfügung. Die Laborproben Avicel und BWL mit einer größeren DS-Spanne standen dagegen zum damaligen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung) deutlich fehlerbehaftet sein könnte, wurden die erhaltenen Abhängigkeiten als annähernd linear angenommen und jeweils durch eine Gerade angepasst. Die Geradengleichungen und die Regressionskoeffizienten  $R^2$  sind in Tab. 10 angegeben.

Tab. 10: Geradengleichungen und Regressionskoeffizienten der linearen Regressionen für unterschiedliche Bandenhöhen- (H) sowie Bandenflächenverhältnisse (F) aufgetragen gegen DS.

Bandenhöhen- (H) bzw. Bandenflächen- (F) verhältnis	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
H <sub>1715</sub> /H <sub>1059</sub> (Basislinien 1808 cm <sup>-1</sup> –1650 cm <sup>-1</sup> bzw. 1190 cm <sup>-1</sup> –916 cm <sup>-1</sup> )	H <sub>1715</sub> /H <sub>1059</sub> = 0.0987 + 0.2295 · DS	0.96
H <sub>1578</sub> /H <sub>1059</sub> (Basislinien 1650 cm <sup>-1</sup> –1508 cm <sup>-1</sup> bzw. 1190 cm <sup>-1</sup> –916 cm <sup>-1</sup> )	H <sub>1578</sub> /H <sub>1059</sub> = 0.3817 + 0.1477 · DS	0.72
H <sub>1423</sub> /H <sub>1059</sub> (Basislinien 1508 cm <sup>-1</sup> –1344 cm <sup>-1</sup> bzw. 1190 cm <sup>-1</sup> –916 cm <sup>-1</sup> )	H <sub>1423</sub> /H <sub>1059</sub> = 0.2389 + 0.1574 · DS	0.99
(H <sub>1715</sub> +H <sub>1578</sub> )/H <sub>1059</sub> (Basislinien wie oben)	(H <sub>1715</sub> +H <sub>1578</sub> )/H <sub>1059</sub> = 0.4803 + 0.3771 · DS	0.88
F <sub>1808-1650</sub> /F <sub>1190-916</sub> (Basislinien gleich Peakgrenzen)	F <sub>1808-1650</sub> /F <sub>1190-916</sub> = 0.0380 + 0.1343 · DS	0.97
F <sub>1650-1508</sub> /F <sub>1190-916</sub> (Basislinien gleich Peakgrenzen)	F <sub>1650-1508</sub> /F <sub>1190-916</sub> = 0.1448 + 0.0984 · DS	0.95
F <sub>1508-1344</sub> /F <sub>1190-916</sub> (Basislinien gleich Peakgrenzen)	F <sub>1508-1344</sub> /F <sub>1190-916</sub> = 0.1602 + 0.1115 · DS	0.99
F <sub>1808-1508</sub> /F <sub>1190-916</sub> (Basislinien gleich Peakgrenzen)	F <sub>1808-1508</sub> /F <sub>1190-916</sub> = 0.2068 + 0.2922 · DS	0.98

Aus Tab. 10 wird klar, dass die Auswertungen 1, 3, 5 – 8 zu guten Korrelationen führen. Da die Empfindlichkeit der Methode mit der Steigung der Kalibrierkurve besser wird, wurde die Auswertung 8 (in Abb. 52 gezeigt) für die Bestimmung der DS-Werte einzelner Fraktionen der Gradientenchromatographie verwendet.

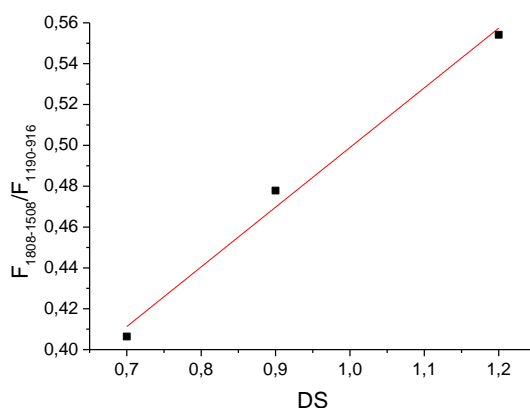


Abb. 52: FTIR-Kalibrierkurve zur DS-Bestimmung der chromatographischen Fraktionen. Die Gerade korrespondiert zur Gleichung:  $F_{1808-1508}/F_{1190-916} = 0.2068 + 0.2922 \cdot DS$ .

## Bestimmung des DS-Verlaufes über die Polymerpeaks in der Gradientenchromatographie

Nachdem die beste Korrelation zwischen den FTIR-Bandenintensitäten und DS für CMCn nach der chromatographischen Trennung bestimmt war, wurde versucht den DS-Verlauf über die Polymerpeaks in der Gradientenchromatographie zu bestimmen. Hierzu wurden zunächst die Bandenflächenverhältnisse  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$  der bei den unterschiedlichen Retentionszeiten erhaltenen Spektren berechnet und diese in Abb. 53 dann gegen die Elutionszeit aufgetragen. Zur besseren Veranschaulichung wie sich das Bandenflächenverhältnis über die Peaks ändert wurden zusätzlich noch die entsprechenden Chemigramme dargestellt.

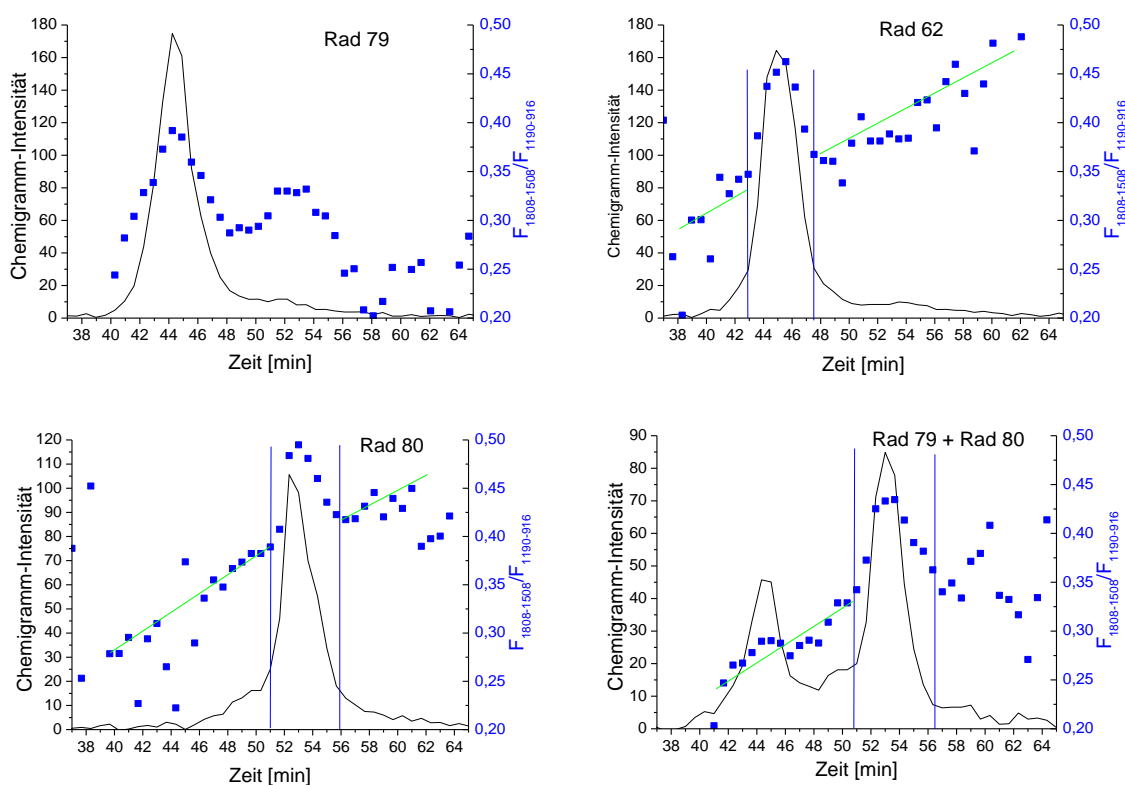


Abb. 53: Verlauf der Bandenflächenverhältnisse  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$  als Funktion der Elutionszeit der Proben Rad 79 (oben links), Rad 62 (oben rechts), Rad 80 (unten links) und Mischung Rad 79 + Rad 80 (w/w = 1/1) (unten rechts). Die blauen Linien grenzen die Bereiche ab, innerhalb derer die Schichtdicke vermutlich einen signifikanten Einfluss auf das Bandenflächenverhältnis ausübt. Die grünen Linien stellen den groben Verlauf der Bandenflächenverhältnisse außerhalb der blauen Bereiche dar.

Für die Proben Rad 62 und Rad 80 und für die Probenmischung Rad 79 + Rad 80 kann in den mit grünen Geraden gekennzeichneten Bereichen ein Anstieg des Bandenflächenverhältnisses mit der Elutionszeit beobachtet werden. Dies wurde auch aufgrund der Abhängigkeit des



Elutionsvolumens von DS für Proben unterschiedlicher DS Werte erwartet (siehe Abb. 28). Die Streuung an den beiden Flanken der Chemigramme können auf die geringen Signal/Rausch-Verhältnisse der FTIR-Spektren zurückgeführt werden, welche aufgrund der geringen Probenmengen resultieren. Innerhalb der mit blauen Linien eingegrenzten Bereiche steigt allerdings das Bandenflächenverhältnis mit der Elutionszeit zunächst steil an und fällt dann wieder steil ab. In diesen Bereichen scheint es so zu sein, als ob das gleiche Bandenflächenverhältnis und damit der gleiche DS-Wert an zwei unterschiedlichen Stellen des Chromatogrammes auftreten würden. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, dass das Bandenflächenverhältnis neben dem DS-Wert auch durch die durchstrahlte Schichtdicke beeinflusst wird. Innerhalb der blauen Bereiche scheint es so zu sein, als ob die Schichtdickeneffekte so groß sind, dass sie die weniger ausgeprägten DS-Unterschiede entlang der Chemigramme überdecken, so dass diese nicht detektiert werden können. Um diese Annahme zu überprüfen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, die später beschrieben werden. Die Probe Rad 79 zeigt im Unterschied zu den anderen Proben keine Bereiche gleichmäßig ansteigender Bandenflächenverhältnisse. Hingegen treten zwei ausgeprägte Maxima der Bandenintensitäten auf, wobei eines der beiden dem Maximum des Chemigramms entspricht und somit auf den oben genannten Schichtdickeneinfluss zurückgeführt werden könnte. Der Ursprung des zweiten Maximums kann an dieser Stelle nicht eindeutig erklärt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben dem DS auch andere Parameter die Bandenflächenverhältnisse beeinflussen, wobei vermutet wird, dass ein entscheidender Parameter in der Schichtdicke liegt. Um den Schichtdickeneinfluss näher zu untersuchen wurden ähnliche Experimente wie bei der Kalibration mittels Stufengradienten (siehe Abb. 50) durchgeführt, wobei die Injektionsmenge an Rad 80 durch unterschiedliche Injektionsvolumen variiert wurde (5, 10, 20  $\mu\text{L}$ ). Hierdurch werden unterschiedliche Schichtdicken einer eluierenden CMC auf der Germaniumplatte simuliert. Aus den über den Elutionsbereich gemittelten FTIR-Spektren wurden die Bandenflächenverhältnisse  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$  bestimmt und in Abb. 54 als Funktion der injizierten Probenmenge (m) aufgetragen. Man erkennt mit ansteigender Probenmenge und damit ansteigender mittleren Schichtdicke einen signifikanten Anstieg des Bandenflächenverhältnisses, was die oben aufgestellte Vermutung eines Einflusses der Schichtdicke auf das Bandenflächenverhältnis bestätigt.

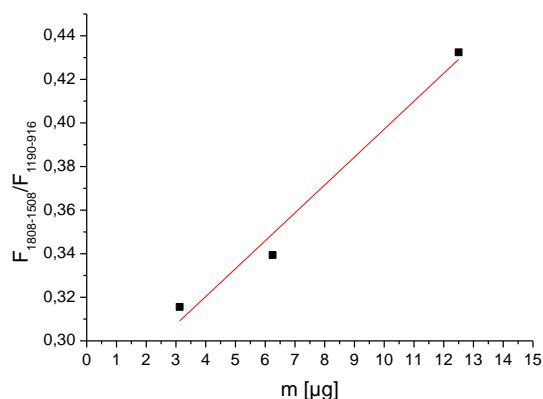


Abb. 54: Bandenflächenverhältnis  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$  (Basislinien gleich den Peakgrenzen) als Funktion der injizierten Probenmenge  $m$  für die Probe Rad 80. Probenkonzentration 0.625 g/L. Injektionsvolumen 5, 10, 20 µL. Die Gerade wurde durch die lineare Anpassung erhalten, Gleichung  $F_{1808-1508}/F_{1190-916} = 0.2691 + 0.0128 \cdot m$ .

In Abb. 55 ist die bei einem bestimmten Elutionszeitpunkt nach dem Aufsprühen des Eluates auf der Germaniumplatte vorliegende Probenmenge ( $m$ ) von Rad 80 dargestellt. Dieses Profil wurde aus dem Chemigramm der Rad 80 Abb. 48 in berechnet, wobei angenommen wurde, dass die Chemigrammintensität linear von der Probenmenge abhängt.

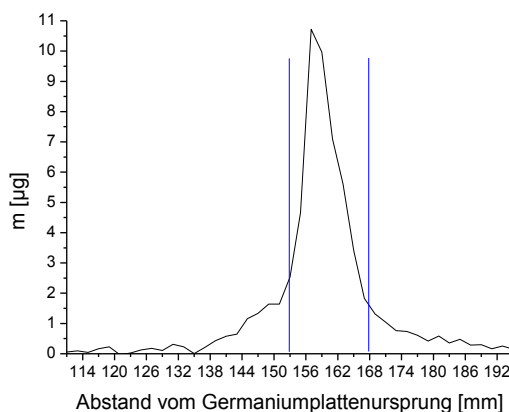


Abb. 55: Berechnete Probenmenge  $m$  als Funktion der Position auf der Germaniumplatte für Rad 80.

Aus Abb. 55 wird klar, dass innerhalb des blau eingegrenzten Bereiches, welcher zu dem Bereich des steilen Anstiegs bzw. Abfalls des Bandenflächenverhältnisses in Abb. 53 korrespondiert, die Probenmenge entlang der Germaniumplatte zwischen ca. 2 µg (am Minimum) und ca. 11 µg (am Maximum) variiert. Aus Abb. 54 kann entnommen werden, dass sich in diesem Probenmengenbereich das Bandenflächenverhältnis aufgrund der

unterschiedlichen Probenmengen um ca. 0.1 Einheiten ändert. Hingegen ändert sich das Bandenflächenverhältnis aufgrund der DS-Variation in demselben Bereich nur um ca. 0.06 Einheiten, wie aus der Kalibrierkurve in Abb. 52 abgeschätzt werden kann, wenn man annimmt, dass in diesem Bereich eine DS-Änderung von ca.  $\Delta DS = 0.25$  vorliegt. Diese Abschätzung erscheint anhand der im Kapitel 4.2 ermittelten DS-Verteilungen realistisch. Somit wird das Bandenflächenverhältnis im blau eingegrenzten Bereich aufgrund der Probenmenge (oder Schichtdicke) deutlich stärker verändert als durch die Variation des DS. Um somit durch LC-FTIR die DS-Änderung entlang des Chromatogramms detektieren zu können, müssten die LC Transform Experimente schichtdickenunabhängig gestaltet werden. Dies könnte z.B. dadurch erreicht werden, dass die Proben zunächst im Gradienten fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen dann auf die gleiche Konzentration verdünnt und anschließend ohne Säule auf die Germaniumplatte gesprüht werden. Dieses Verfahren wäre jedoch extrem aufwendig. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass im Laufe der Gradiententrennung die Germaniumplattengeschwindigkeit verändert wird, so dass diese sich beim Erreichen des Peakmaximums schneller bewegt, als bei geringeren Konzentrationen. Dadurch könnte eine annähernd konstante Schichtdicke des abgeschiedenen Polymers auf der Germaniumplatte erreicht werden. Auch diese Methode ist schwierig realisierbar, da die Vorschubgeschwindigkeit des Sammelmoduls anhand der Konzentration gesteuert werden müsste.

Wenn jedoch keine anderen Faktoren außer der Schichtdicke und dem DS das vorliegende Bandenflächenverhältnis beeinflussen, könnte man theoretisch den Beitrag der Schichtdicke zum Bandenflächenverhältnis rechnerisch korrigieren, um den reinen DS-abhängigen Beitrag zu ermitteln. Hierbei wird angenommen, dass das Bandenflächenverhältnis linear sowohl von DS and auch von der vorliegenden Probenkonzentration abhängt. In diesem Falle gilt für das Bandenflächenverhältnis:

$$F_{18081508}/F_{1190916} = A + B \cdot DS + C \cdot m$$

Gleichung 27

wobei  $F_{1808-1508}/F_{1190-916}$  – das experimentell bestimmte Bandenflächenverhältnis (Zahlen stehen für die Peakgrenzen), A – das Bandenflächenverhältnis bei  $DS = 0$  (stimmt mit dem Achsenabschnitt der Auswertung 8 in Tab. 10 überein), B – die Konstante, die die DS-Abhängigkeit beschreibt (stimmt mit der Steigung der Auswertung 8 in Tab. 10 überein,

$B = 0.2922$ ),  $DS$  – Substitutionsgrad der Ketten bei einer bestimmten Elutionszeit,  $C$  – die Konstante, die die Probenmengenabhängigkeit beschreibt (stimmt mit der Steigung in Abb. 54 überein,  $C = 0.0128$ ),  $m$  – die durchstrahlte Probenmenge (Schichtdicke), die aus dem Probenmengenprofil in Abb. 55 an jedem Elutionspunkt bestimmt werden kann.

Aus Gleichung 27 wird deutlich, dass die Differenz  $F_{18081508}/F_{1190916} - C \cdot m$  keine Schichtdickenabhängigkeit mehr aufweisen soll. Diese Werte wurden für alle Proben sowie Probenmischung an jedem Elutionspunkt bestimmt und in Abb. 57 gegen die Elutionszeit aufgetragen. Dabei wurde angenommen, dass die Konstante  $C$   $DS$ -unabhängig ist und sich mit der Elutionszeit somit nicht ändert. Hierfür wurde der für Rad 80 ermittelte Wert für alle Proben übernommen.

Um den Verlauf der  $DS$ -Werte über den Polymerpeak aus den korrigierten Bandenflächenverhältnissen  $F_{18081508}/F_{1190916} - C \cdot m$  zu bestimmen, muss auch die zuvor erstellte Kalibrierkurve (Abb. 52) um die verwendete Schichtdicke korrigiert werden. Hierzu wurden nicht die experimentell bestimmten Bandenflächenverhältnisse, sondern die entsprechende Differenz  $F_{18081508}/F_{1190916} - C \cdot m$  in Abb. 56 als Funktion von  $DS$  aufgetragen.

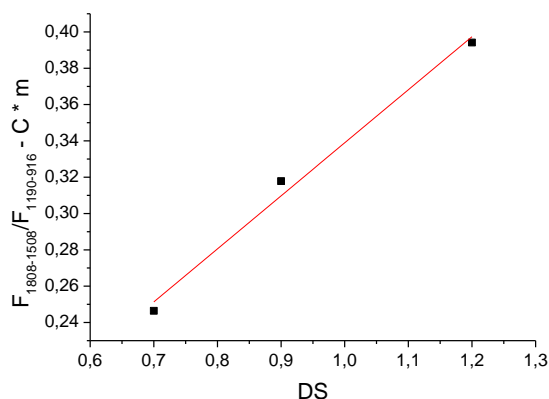


Abb. 56: Um den Schichtdickenbeitrag korrigierte FTIR-Kalibrierkurve zur  $DS$ -Bestimmung der chromatographischen Fraktionen. Die Gerade gibt den Zusammenhang  $F_{18081508}/F_{1190916} - C \cdot m = 0.0468 + 0.2922 \cdot DS$  wieder.

Mithilfe dieser Kalibrierkurve wurden die  $DS$ -Profile als Funktion des Elutionsvolumens erneut berechnet. Diese sind zusammen mit den korrigierten Bandenflächenverhältnissen in Abb. 57 dargestellt.

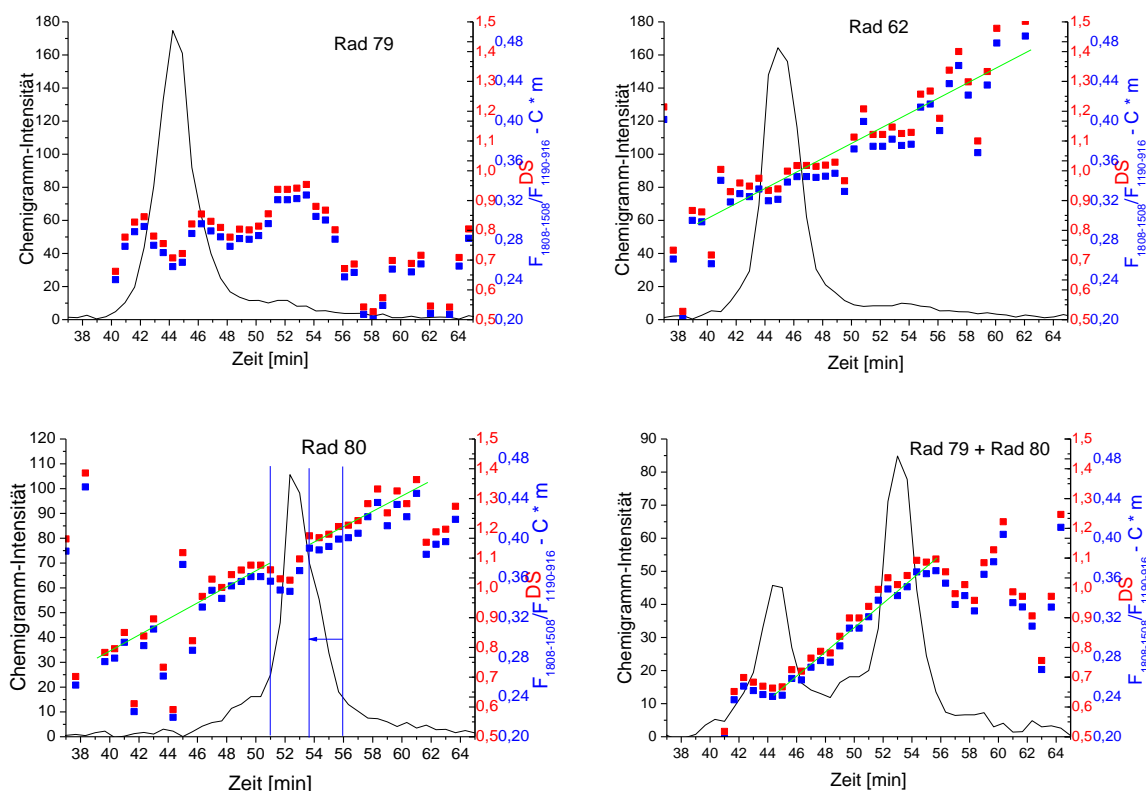


Abb. 57: Verlauf der korrigierten Bandenflächenverhältnisse  $F_{1808-1508}/F_{1190-916} - C \cdot m$  sowie der berechneten DS-Werte über die Chemigramme der Proben Rad 79 (oben links), Rad 62 (oben rechts), Rad 80 (unten links) und der Mischung Rad 79 + Rad 80 (w/w = 1/1) (unten rechts). Der blau eingegrenzte Bereich stimmt mit Abb. 53 überein. Die grünen Linien stellen den groben Verlauf  $F_{1808-1508}/F_{1190-916} - C \cdot m$  sowie DS dar.

Wie man erkennt, führt die durchgenommene Korrektur des Konzentrations- bzw. Schichtdickeneffektes zu einer erheblich geringeren Abweichung der DS-Werte im Bereich der Peakmaxima verglichen zu den Bereichen mit den niedrigeren Konzentrationen. In Abb. 57 kann über weite Bereiche der Chromatogramme ein klarer Anstieg des DS mit der Elutionszeit beobachtet werden, welcher mittels grüner Linien dargestellt ist. Die Streuung an den beiden Flanken der Chemigramme resultiert, wie schon erwähnt, aus den geringen Signal/Rausch-Verhältnissen der FTIR-Spektren. Die noch vorliegenden Abweichungen im Bereich der Peakmaxima können aus der angenommenen linearen Konzentrationsabhängigkeit sowie Fehlern in den konstanten A, B, und C resultieren, welche lediglich auf drei-Punkt-Kalibrationen (Abb. 56 und Abb. 54) beruhen. Dennoch ist feststellbar, dass im Rahmen der Genauigkeit DS über den Elutionsbereich der Proben sich verändert und somit auch innerhalb einer Probe eine Trennung nach DS realisiert wird. Für die Probe Rad 79 kann ein weniger ausgeprägter Anstieg der DS-Werte mit der Elutionszeit beobachtet werden, was eventuell durch geringere DS-Heterogenität dieser Probe verglichen

mit den anderen Proben hervorgerufen wurde, so dass der Molmasseneinfluss auf die Trennung in der Gradientenchromatographie nicht mehr vernachlässigbar ist. Für Rad 62 und Rad 80, die offensichtlich überwiegend nach DS im Gradienten getrennt werden, sollen die DS-Werte der Fraktionen bei bestimmten Elutionszeiten annähernd übereinstimmen. Die Abhängigkeiten DS vs. Elutionszeit in der Gradientenchromatographie (aus Abb. 57) sind in Abb. 58 für die beiden Proben überlagert.

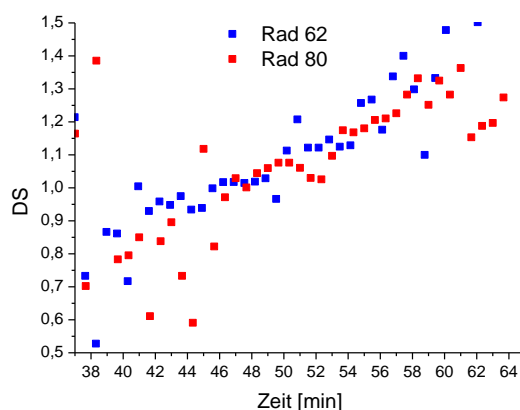


Abb. 58: Überlagerung der Abhängigkeiten DS (bestimmt mittels FTIR) vs. Elutionszeit in der Gradientenchromatographie für die technischen Proben Rad 62 und Rad 80.

Wie erwartet, stimmen die beiden Abhängigkeiten gut überein, was bedeutet, dass unabhängig von der Probe die DS-Werte der bei einer bestimmten Elutionszeit eluierenden Fraktionen identisch sind. Dies belegt erneut, dass der entwickelte Gradient die meisten CMCn (nicht die Probe Rad 79) nach dem DS der Polymerketten trennt.

Um zusätzlich die Plausibilität der erhaltenen DS-Profile über die Gradientenpeaks zu überprüfen, wurde auf deren Basis die gewichtsmittleren  $DS_{w,rück}$ -Werte der Proben sowie der Probenmischung nach Gleichung 28 zurückberechnet.

$$DS_{w,rück} = \frac{\sum DS_{Zeit} \cdot I_{Zeit}}{\sum I_{Zeit}}$$

Gleichung 28

wobei  $DS_{Zeit}$  bzw.  $I_{Zeit}$  – der mittlere Substitutionsgrad der Ketten bzw. die Chemigrammintensität bei einer bestimmten Elutionszeit ist.

Es wurden die in Tab. 11 wiedergegebenen Werte erhalten.

Tab. 11:  $DS_{w,rück}$ -Werte der Proben, die auf der Basis der DS-Profile in Abb. 57 zurückberechnet wurden.

Probe bzw. Mischung	DS aus Tab. 15	$DS_{w,rück}$	Relative Abweichung $DS_{w,rück}$ von DS aus Tab. 15 [%]
Rad 79	0.7	0.76	+ 8.6
Rad 62	0.9	0.98	+ 8.9
Rad 80	1.2	1.11	- 7.5
Rad 79 + Rad 80	$0.95^{\text{berechnet}}$	0.86	- 9.5

Die relativen Abweichungen liegen alle unter 10 %, zeigen keinen eindeutigen Trend und können auf alle oben angesprochenen Ursachen zurückgeführt werden. Die geringen Abweichungen deuten darauf hin, dass die DS-Werte der Gradientenfraktionen mithilfe der dargestellten FTIR-Methode korrekt bestimmt werden konnten, allerdings unter der Voraussetzung der korrekten Kalibrierkurve. Die FTIR-Untersuchungen belegen somit erneut eindrucksvoll, dass in der Gradientenchromatographie die NaCMC-Proben hauptsächlich nach den DS-Werten der unterschiedlich substituierten Polymerketten getrennt wurden. Somit ist es möglich basierend auf den Gradientenelutionskurven die DS-Verteilungen von NaCMC-Proben zu berechnen, was für die Laborproben Avicels und BWLs im Kapitel 4.2 bereits erfolgte.

In diesem Kapitel konnte mittels LC-FTIR-Kopplung nachgewiesen werden, dass in der Gradientenchromatographie nicht nur eine Trennung von Proben unterschiedlicher mittlerer DS-Werte, sondern auch eine Trennung innerhalb einer Probe nach DS erreicht werden kann. Die Kombination der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie ermöglicht auch die Bestimmung von DS-Verteilungen individueller Proben (chemischer Heterogenität) unabhängig von der Molmasse, wobei Kalibrationskurven mit Proben beliebiger Molmasse erstellt werden können.

#### 4.4 Charakterisierung der NaCMCn durch zweidimensionale Flüssigchromatographie

Die in Kapitel 4.1 entwickelte SEC-Methode erlaubt eine Trennung der CMCn nach der Molekülgröße. Jedoch können dabei keine Informationen über den DS bzw. die DS-Verteilung der bezüglich des hydrodynamischen Volumens einheitlichen Fraktionen

gewonnen werden. Umgekehrt, erlaubt die in Kapitel 4.2 entwickelte Gradientenmethode eine Trennung nach dem Substitutionsgrad, jedoch können keine Informationen darüber erhalten werden, ob sich die Ketten einheitlichen Substitutionsgrades in ihren Molekulargewichten und Molekulargewichtsverteilungen unterscheiden. Daher sollte abschließend versucht werden die erarbeiteten eindimensionalen Methoden im Sinne einer 2D-Trennmethode online miteinander zu koppeln, so dass eine umfassende Analyse der NaCMCn sowohl bezüglich DS als auch bezüglich der Molekulargewichte realisiert werden kann. Eine derartige Methode würde auch ermöglichen Korrelationen zwischen der chemischen Zusammensetzung und dem Molekulargewicht in den verwendeten Proben zu identifizieren. Außerdem wäre es möglich weitere Informationen zum Einfluss des Molekulargewichtes auf das Retentionsvolumen in der Gradientenchromatographie zu erhalten. Basierend auf den Überlegungen im theoretischen Teil wurde die Gradientenchromatographie in der ersten und die SEC in der zweiten Trenndimension verwendet.

#### *Auswahl geeigneter Probenmengen und Flussraten*

Verglichen mit den eindimensionalen Trennungen erfordert eine 2D-Trennung höhere Substanzmengen, die in die erste Trenndimension injiziert werden, damit auch nach der Trennung in der zweiten Dimension noch eine hinreichende Konzentration vorliegt, um Detektorsignale mit einem guten Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten. Im einfachsten Fall können hierfür die Proben mit höheren Konzentrationen gelöst werden. Für die in dieser Arbeit untersuchten NaCMCn war dies jedoch nicht möglich, da insbesondere die hochmolekularen BWL-Proben schon bei vergleichsweise kleinen Konzentrationen von ca. 3 g/L sehr hohe Viskositäten aufweisen. Theoretisch könnte die injizierte Substanzmenge auch dadurch erhöht werden, dass nicht die Konzentration, sondern das Injektionsvolumen der Proben erhöht wird. Da, allerdings, das vorhandene chromatographische System ein Injektionsvolumen von 100  $\mu\text{L}$  hatte und außerdem hohe Injektionsvolumen Bandenverbreiterung begünstigen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein anderer Lösungsweg entwickelt. Hierbei wurde die Erhöhung der in das chromatographische System eingebrachten Substanzmenge durch zehn nacheinander folgender Injektionen der verdünnten Lösungen realisiert. Während dieser Injektionen wurde eine isokratische Betriebsweise bei der Eluentenzusammensetzung, die mit dem Eluenten am Anfang des späteren Gradienten übereinstimmt, verwendet. Der Gradient selbst wurde während dieser Injektionsphase nicht gestartet. Hierdurch sollte die Probe bis zur letzten Injektion am Säuleneingang adsorbiert



bleiben. Um Zeit zu sparen, wurde die Injektionsprozedur bei einer Flussrate von 1 mL/min und nicht bei der für die online Kopplung notwendigen Flussrate durchgeführt. Das Eluat der ersten Dimension wurde während der Injektionen nicht in die zweite Dimension, sondern in den Abfall geleitet. Unmittelbar nach der zehnten Injektion wurde die Flussrate in der ersten Dimension auf die für die online 2D-Kopplung notwendige Flussrate reduziert. Nachdem sich der Gegendruck in der ersten Dimension stabilisiert hatte, wurde der Gradient in der ersten Dimension gestartet. Gleichzeitig wurde auch das Transferventil aktiviert und damit das Eluat der ersten Dimension in regelmäßigen Abständen in die zweite Dimension injiziert.

Zunächst galt es zu prüfen, ob die Verwendung der hohen Probenmengen nicht zu einer Säulenüberladung und damit zu einer signifikanten Verschlechterung der Trennleistung in der ersten Trenndimension führt. Hierzu wurden an ausgewählten Proben Gradiententrennungen mit der in Kapitel 4.2 entwickelten Gradientenmethode durchgeführt, wobei lediglich die für die 2D-Analysen beabsichtigte Injektionsprozedur verwendet wurde, aber alle anderen Parameter der Gradiententrennung beibehalten wurden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 59 dargestellt.

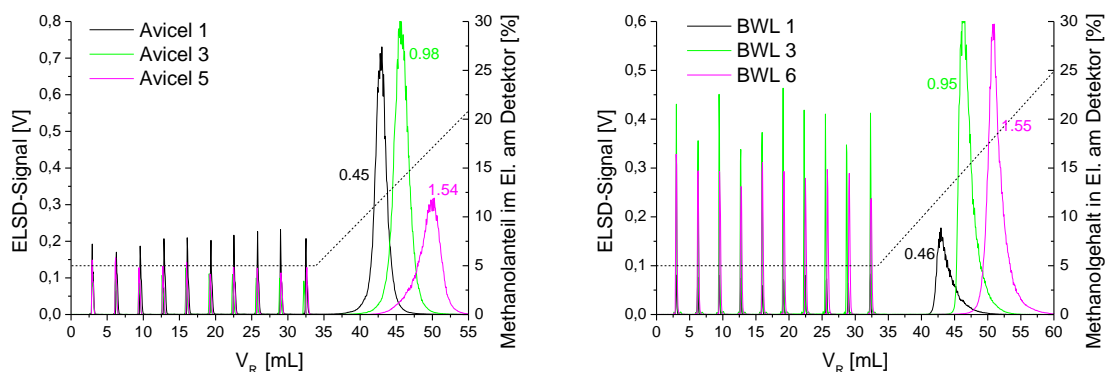


Abb. 59: Überlagerungen der Chromatogramme der konventionellen Gradiententrennungen von Avicels (links) und BWLs (rechts): Avicel 1 und BWL 1 – schwarz, Avicel 3 und BWL 3 – grün, Avicel 5 und BWL 6 – violett in einem 40 min linearen Gradienten von Wasser/Methanol (beide mit Puffer bei pH = 4.1) = 95/5 nach 65/35. Injektionsprozedur: zehn nacheinander folgende Injektionen (Konzentration 1 g/L, Injektionsvolumen je 100  $\mu$ L). Die gestrichelte Linie gibt den Methanolanteil im Eluenten am Detektor an.

Sowohl für die Avicel- als auch die BWL-Proben kann im Elutionsbereich zwischen dem Totvolumen der Säule (3 mL) und dem Start des Gradienten bei ca. 33 mL eine Serie sehr schmaler Peaks in annähernd äquidistanten Abständen von 3.2 mL detektiert werden. Die Peakabstände entsprechen genau der Zeit (bzw. dem Volumen) zwischen zwei Injektionen. Somit erscheint jeder Peak im Chromatogramm nach der entsprechenden Injektion um das

Totvolumen verzögert, d.h. die Peaks sind weder adsorbiert noch ausgeschlossen. Wie im Kapitel 4.2 beschrieben wurde, werden diese Peaks durch Natriumacetat verursacht, welches durch den Gegenionenaustausch zwischen den Polymerketten und dem Puffer gebildet wird und am Totvolumen der Säule eluiert. Die Abwesenheit zusätzlicher Peaks in diesem Bereich spricht dafür, dass das Polymermaterial am Anfang des Experimentes vollständig auf der Säule adsorbiert, wie es erhofft wurde. Die CMC-Ketten eluieren entsprechend ihrem DS im Gradienten zwischen 36 und 60 mL. Um zu überprüfen ob die erhöhte Probenmenge zur einen Säulenüberladung und/oder zu einer Verschlechterung der Trennung nach DS im Gradienten führt, werden in Abb. 60 die Peaks der Mehrfachinjektionen mit den Peaks der einfachen 100  $\mu$ L Injektion aus Abb. 26 überlagert. Zur besseren Veranschaulichung wurden die ELSD-Signalintensitäten jeweils auf das Peakmaximum normiert. Außerdem wurden die Chromatogramme der zehnfachen Injektion jeweils um 29.69 mL nach links verschoben. Dieses Volumen entspricht der Volumendifferenz zwischen den beiden Gradientenstartpunkten.

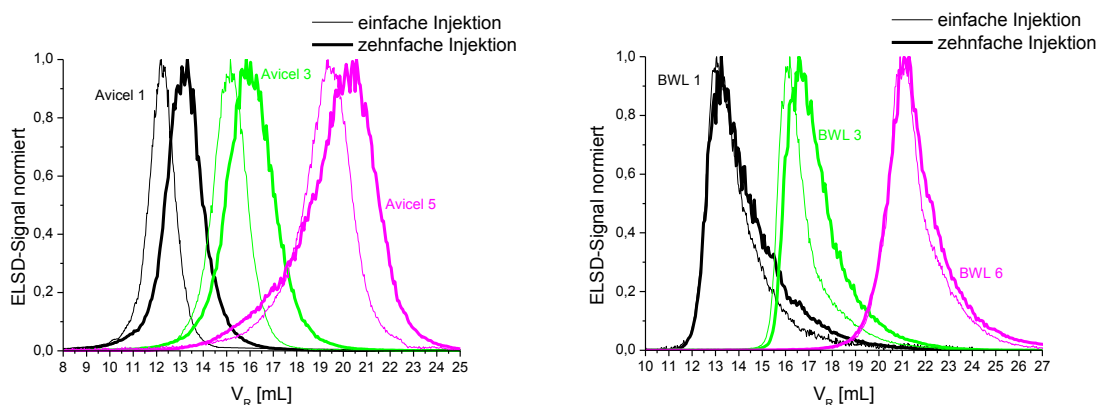


Abb. 60: Überlagerungen der Polymerpeaks, resultierende aus den konventionellen Gradiententrennungen. Dünne Linie – einfache 100  $\mu$ L-Injektion (aus Abb. 26), dicke Linie – zehnfache 100  $\mu$ L-Injektion. ELSD-Signalintensitäten wurden jeweils auf das Polymerpeakmaximum normiert. Die Chromatogramme der zehnfachen 100  $\mu$ L-Injektion wurden jeweils um 29.69 mL nach links verschoben.

Eine Säulenüberladung tritt dann ein, wenn nicht genügend Adsorptionsplätze für das ganze injizierte Material zur Verfügung steht und deswegen ein Teil des Materials nicht oder schwächer adsorbiert wird. Aus diesem Grund sind die Elutionskurven bei Säulenüberladung verglichen mit den Kurven ohne Säulenüberladung zu geringeren Elutionsvolumen verschoben. Dies trifft allerdings für den vorliegenden Fall nicht zu. Es wird eher das umgekehrte Verhalten beobachtet (siehe Abb. 60). Die Positionen der einzelnen Peaks bzw. der Peakmaxima bei den Injektionen mit höheren Probenmengen sind zu leicht höheren

Volumen verschoben, wobei die Verschiebung für Avicels stärker ausgeprägt ist als für BWLs. Denkbar wäre, dass Ketten, die frühzeitig in das System injiziert wurden, mehr Zeit zur Verfügung stand um Konformationen auszubilden, die stärkere Wechselwirkungen der Polymerketten mit der stationären Phase erlauben. Da innerhalb der Probenreihen alle Proben um etwa die gleichen Beiträge verschoben sind, scheint die Volumenverschiebung nicht durch den DS beeinflusst zu werden. Allerdings scheint die Verschiebung von der Molmasse beeinflusst zu werden, da der beschriebene Effekt bei niedermolekularen Avicels stärker als bei hochmolekularen BWLs ausgeprägt ist. Dies ist nicht besonders verwunderlich, wenn man bedenkt, dass, nur da, wo der Molmasseneinfluss auf die Trennung überhaupt auftritt, und das scheint für Avicel der Fall zu sein (mehr dazu siehe unten), dieser auch stärker durch die höhere Beladung der Säule verändert werden kann.

Wenn die Trennungen nach DS innerhalb der einzelnen Chromatogramme betrachtet werden, dann kann festgestellt werden, dass die Peakformen der einzelnen Elutionskurven nach der Erhöhung der Injektionsmenge nahezu erhalten bleiben, allerdings wird eine Verbreiterung der Peaks bei Erhöhung der Injektionsmenge beobachtet, welche wiederum für Avicels stärker ausgeprägt ist. Das kann eine weitere Folge des oben beschriebenen Effektes der Verstärkung des Molmasseneinflusses auf die Trennung nach der Erhöhung der Injektionsmenge sein. Trotz dieser Beobachtungen ist offensichtlich, dass die beschriebenen Effekte nur sehr gering sind und keinen starken Einfluss auf die Trennungen nach DS ausüben. Zudem muss beachtet werden, dass 2D-Trennungen im Normalfall für die einzelnen Dimensionen immer mit Kompromissen verbunden sind, die jedoch durch den insgesamt gewonnenen Informationsgewinn gerechtfertigt sind. Folglich kann die verwendete Injektionsprozedur für die geplanten 2D-Experimente verwendet werden.

Neben der injizierten Probenmenge müssen bei online 2D-Trennungen auch die Flussraten in den beiden Trenndimensionen sowohl aufeinander als auch auf das Volumen der verwendeten Injektionsschleifen abgestimmt werden. Die Flussraten in den beiden Dimensionen müssen für eine vollständige (comprehensive) 2D-Analyse so gewählt werden, dass die Zeit, die für einen chromatographischen Lauf in der zweiten Dimension (SEC) benötigt wird, mit der Zeit zum Befüllen der Injektionsschleifen mit dem Eluat der ersten Dimension (Gradiententrennung) exakt übereinstimmt. Deswegen werden typischerweise geringe Flussraten in der ersten und hohe Flussraten in der zweiten Dimension verwendet. Dabei sollen die Trennungen möglichst nicht oder nur wenig durch die Flussratenänderungen

beeinflusst werden, was für den vorliegenden Fall experimentell bestätigt werden konnte. Somit ließ sich experimentell eine online Kopplung der beiden entwickelten Methoden realisieren.

### *Zweidimensionale Trennungen der individuellen Proben*

Unter Verwendung der optimierten Bedingungen wurden 2D-Trennungen aller Avicel- und BWL-Proben sowie einer technischen Probe (Rad 67) ausgeführt.

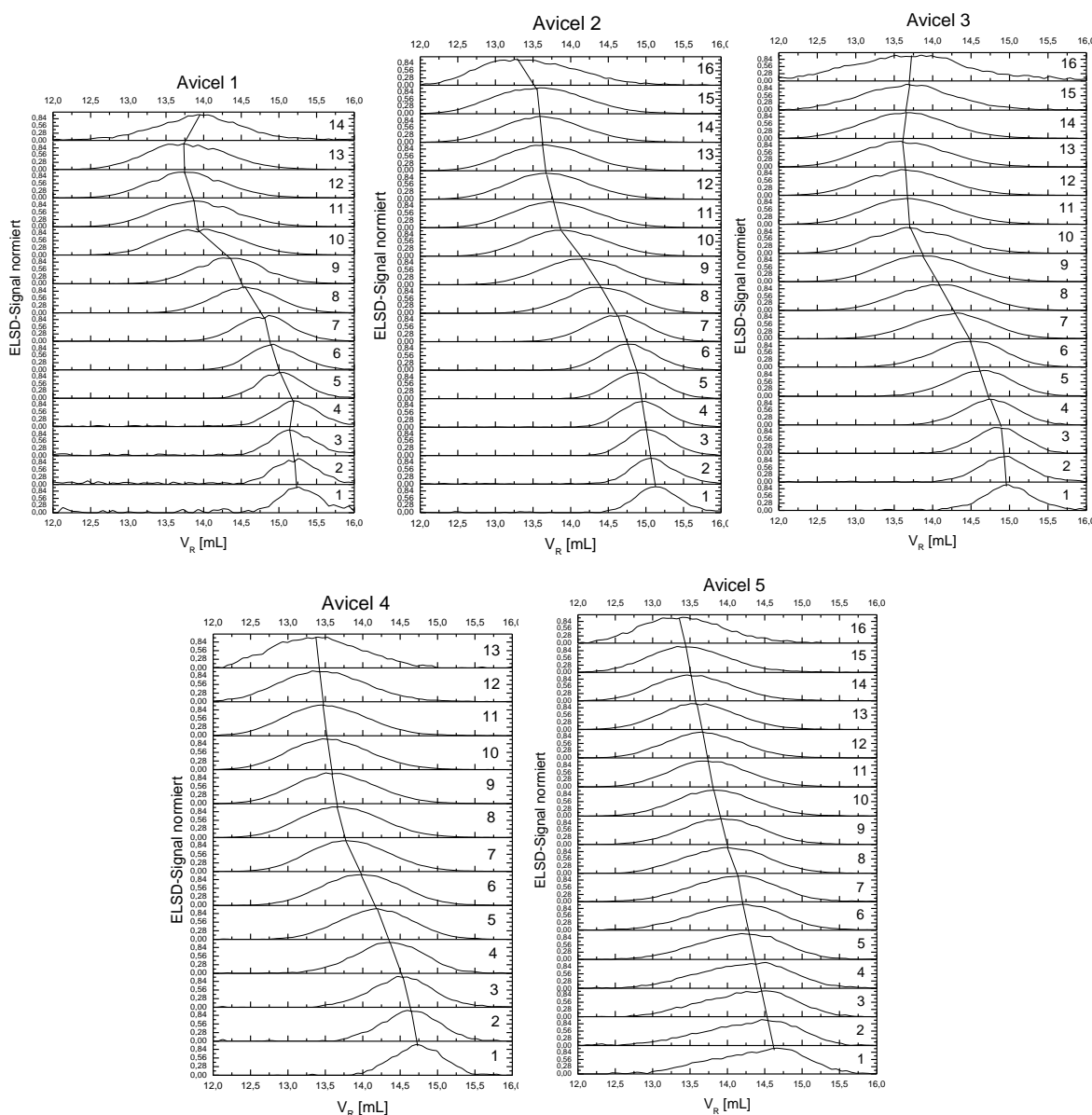


Abb. 61: Normierte SEC-Chromatogramme der individuellen Gradientenfractionen der Avicel-Proben erhalten mittels online 2D-Kopplung der Gradientenchromatographie mit der SEC. Die Fractionen wurden jeweils fortlaufend gezählt.

Um im Gradienten der ersten Dimension eventuelle Molmassenänderungen zwischen den Fraktionen zu detektieren und dies zu analysieren, wurden zunächst die normierten SEC-Chromatogramme individueller Gradientenfraktionen miteinander verglichen (Abb. 61 und Abb. 62). Dabei wurden nur die SEC-Chromatogramme ausgewertet, die akzeptable Signal/Rausch-Verhältnisse zeigten.

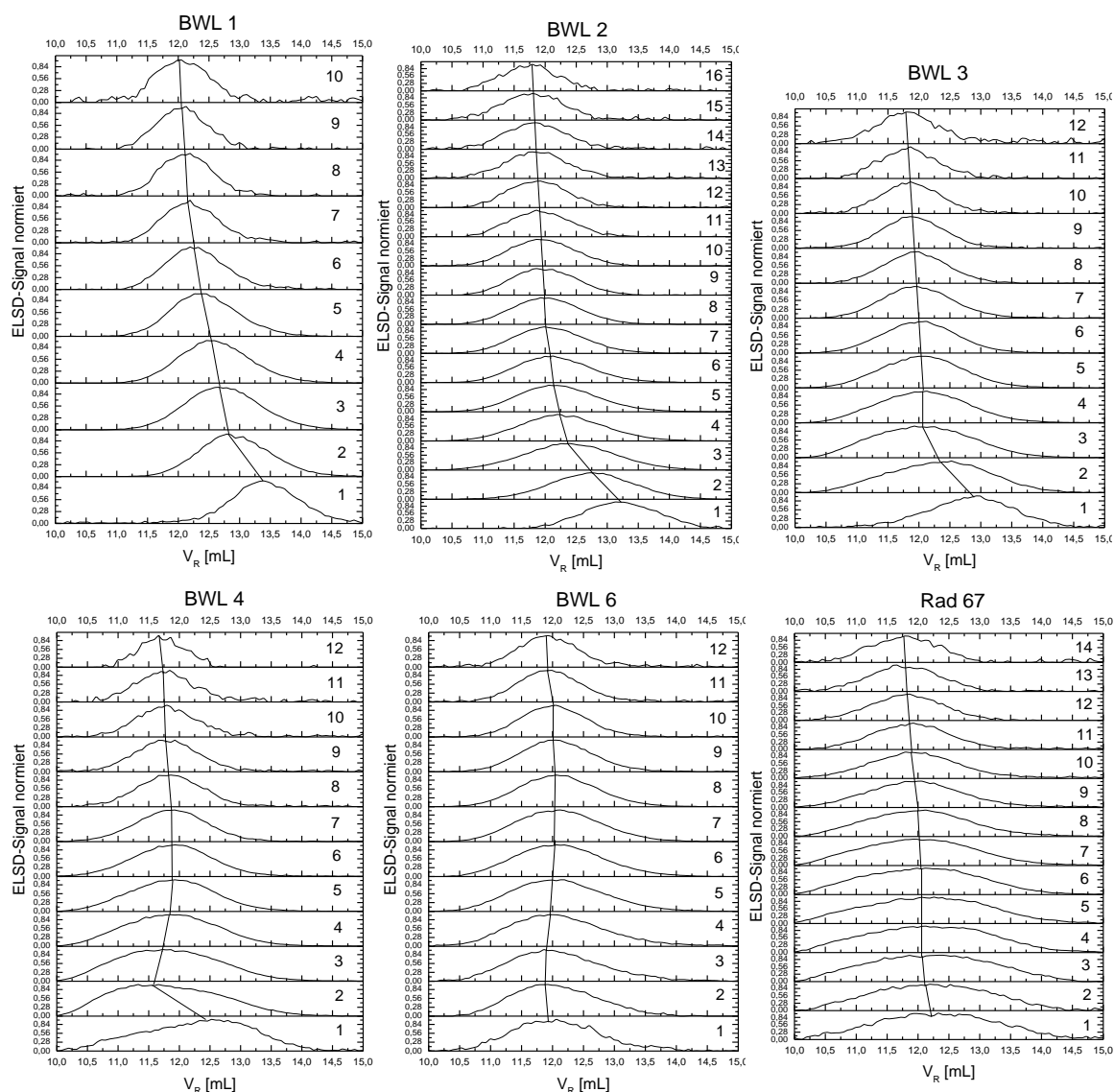


Abb. 62: Normierte SEC-Chromatogramme individueller Gradientenfraktionen der BWL-Proben sowie der technischen Probe Rad 67 erhalten durch online 2D-Kopplung der Gradientenchromatographie mit der SEC. Die Fraktionen wurden jeweils fortlaufend gezählt.

In den Graphiken der individuellen Proben wurden die Peakmaxima der einzelnen SEC-Chromatogramme miteinander verbunden um die Verschiebungen der SEC-Elutionsvolumen zu verdeutlichen. Für Avicels resultieren dabei verglichen mit BWLs etwas stärker

gekrümmten Linien. Dies deutet auf stärkere Molmassenunterschiede der einzelnen Gradientenfraktionen bei den Avicel- verglichen mit den BWL-Proben hin.

Für alle Gradientenfraktionen aller Proben resultieren breite SEC-Kurven, was darauf hindeutet, dass die bezüglich DS homogenen Probenfraktionen heterogen bezüglich des Molekulargewichtes sind. Aus diesen Ergebnissen können mithilfe geeigneter Kalibrierkurven Molmassenverteilungen der Fraktionen mit definierten DS-Werten berechnet werden. Diese sind mit eindimensionalen Methoden nicht zugänglich.

Eine weitere interessante Frage hierbei ist ob man mittels dieser Ergebnisse Informationen zur Molmassenabhängigkeit in der Gradientenchromatographie und/oder über die Korrelation zwischen der Molekulargewichtsverteilung und DS gewonnen werden können. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein Modell entwickelt, welches dann mit den erhaltenen Ergebnissen verglichen wurde. Die Abweichungen vom Modell würden dieses dann falsifizieren. Das Modell erstreckt sich auf die Proben, die keine Abhängigkeit der Molekulargewichtsverteilung vom DS aufweisen. Es galt zu überlegen welche 2D-Chromatogramme zu erwarten wären, wenn solch eine Probe mittels der verwendeten 2D-Methode untersucht wird.

Wenn die Molekulargewichtsverteilung einer Probe unabhängig vom DS ist, dann soll für jeden DS-Wert der Probe ein und dieselbe Molekulargewichtsverteilung resultieren. Dies ist in Abb. 63 links schematisch dargestellt.  $DS_{\text{klein}}$  und  $DS_{\text{groß}}$  stellen die beiden Extrema der DS-Verteilung der Probe dar.

Für jede bezüglich DS homogene Fraktion soll die in Abb. 63 rechts dargestellte Abhängigkeit des Gradientenelutionsvolumens vom SEC-Elutionsvolumen resultieren (z.B. für  $DS_{\text{klein}}$  rote Kurve und  $DS_{\text{groß}}$  schwarze Kurve). Diese Molmassenabhängigkeit der Gradientenretention von chemisch homogenen Proben (Homopolymere) wurde bereits im theoretischen Teil erläutert. Diese Abhängigkeit besagt, dass für große Molmassen (kleine  $SEC-V_R$ ) das Elutionsvolumen in der Gradientenchromatographie (Gradient- $V_R$ ) unabhängig vom Molekulargewicht ist. Für kleine Molmassen (große  $SEC-V_R$ ) hingegen sinkt das Elutionsvolumen in der Gradientenchromatographie (Gradient- $V_R$ ) mit abnehmender Molmasse (steigendem  $SEC-V_R$ ). Das 2D-Chromatogramm der gesamten Probe erhält man durch die Superposition der Kurven für alle in der Probe vorhandene DS-Werte mit  $DS_{\text{klein}}$  und  $DS_{\text{groß}}$  als Grenzwerte. In dieser Abbildung wurden die SEC-Peakmaxima der

Gradientenfractionen mit einer blauen Linie miteinander verbunden um die Verschiebungen der SEC-Elutionsvolumen zu verdeutlichen, wie das schon aus Abb. 61 und Abb. 62 bekannt ist.

Aus Abb. 63 rechts wird deutlich, dass für das genannte Modell bei hinreichend großen Molekulargewichten (kleinen SEC- $V_R$ ) bei den 2D chromatographischen Untersuchungen für jede Gradientenfraction (jeden DS-Wert) sowohl annähernd gleiche SEC-Peaklage (deutlich anhand der nahezu vertikaler blauen Linie in diesem Bereich), als auch annähernd gleiche SEC-Peakbreite (also wenn  $\Delta M_1 \approx \Delta M_2 \approx \Delta M_3$ ) resultieren sollen. Die kleinen Unterschiede zwischen  $\Delta M_1$ ,  $\Delta M_2$ ,  $\Delta M_3$  können vernachlässigt werden, da sie im Bereich der Methodenungenauigkeit liegen und somit schwer detektiert werden können. Bei niedrigen Molmassen hingegen sollte sich bedingt durch die molmassenabhängige Retention in der Gradientenchromatographie die SEC-Peaklage (SEC- $V_{R,max}$ ) zu höheren SEC- $V_R$  verschieben (durch die Krümmung der blauen Linie dargestellt) und die SEC-Peaks schmaler werden (also  $\Delta M_1 \approx \Delta M_2 \approx \Delta M_3 \gg \Delta M_4 \approx \Delta M_5 \approx \Delta M_6$ ). Auch hier können die kleinen Unterschiede zwischen  $\Delta M_4$ ,  $\Delta M_5$ ,  $\Delta M_6$  vernachlässigt werden, da sie im Bereich der experimentellen Fehler liegen.

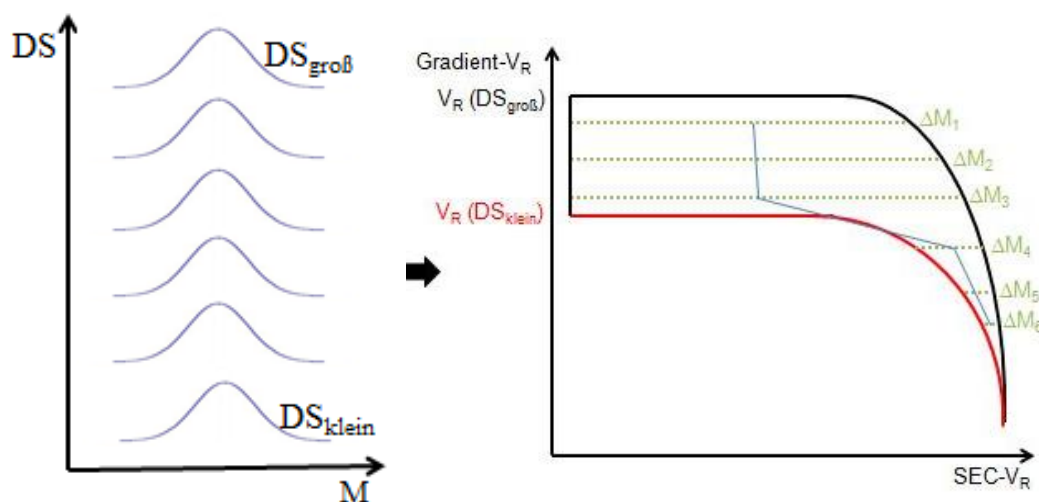


Abb. 63: Links: schematische Darstellung eines Modells, bei dem angenommen wird, dass die Molekulargewichtsverteilung unabhängig vom DS ist.  $DS_{groß}$  und  $DS_{klein}$  sind Extrema der DS-Verteilung. Rechts: ein für dieses Modell erwartetes 2D- Chromatogramm (Darstellung als Konturplot, siehe unten). Die grünen punktierten Linien geben die Breiten der Molekulargewichtsverteilung  $\Delta M$  bei bestimmtem Gradient- $V_R$  wieder. SEC-Peakmaxima wurden mit einer blauen Linie miteinander verbunden.

Vergleicht man nun die Erwartungen des beschriebenen Modells mit den experimentellen Ergebnissen, dann wird deutlich, dass die Verschiebung der Peakmaxima der ersten

Gradientenfractionen der Avicels (bis hin zu den Fraktionen 10 (Avicel 1), 11 (Avicel 2), 10 (Avicel 3) und 8 (Avicel 4)) zu kleineren Molmassen mit dem Modell übereinstimmt. Auch die mit steigender Fraktionsnummer breiter werdenden SEC-Peaks dieser Fraktionen passen zu den Erwartungen des Modells. Bei den späteren Gradientenfractionen beobachtet man eine in der SEC nahezu konstante Peaklage und Peakbreite (für Avicel 1 – 4), was ebenso mit dem Modell übereinstimmt.

Nur für Avicel 5 ergibt sich ein etwas vom Modell und von den anderen Avicels abweichender Verlauf der SEC-Peakmaxima. Man erkennt mit steigender Fraktionsnummer eine kontinuierliche Verschiebung der SEC-Kurven zu größeren Molmassen. Außerdem sind die SEC-Peaks nahezu aller Fraktionen in erster Näherung gleich breit. Eine erheblich geringere chemische Heterogenität dieser Probe verglichen mit anderen Avicels, so dass die Gradiententrennung überwiegend durch die Molmasse bedingt wird, lässt sich hier anhand der Ergebnisse in Kapitel 4.2 (siehe Abb. 30) ausschliessen. Bei dieser Probe scheint somit die Annahme des Modells, dass die Molmassenverteilung unabhängig vom DS ist, nicht erfüllt sein. Im diesem Fall würde die Verschiebung der SEC-Peaks zu den kleineren Volumen mit der steigenden Fraktionsnummer bedeuten, dass der DS dieser Probe mit dem Molekulargewicht steigt. Hierbei sollte man sich in Erinnerung bringen, dass schon bei den Gradiententrennungen für die Probe Avicel 5 ein im Vergleich zu den anderen Avicels unterschiedliches Verhalten gefunden wurde (Anwesenheit eines Frontings). Die Ursache hierfür wurde in der zweistufigen Synthese von Avicel 5 im Unterschied zu den anderen Avicel-Proben vermutet. Die Ergebnisse der 2D-Chromatographie stützen somit die Vermutung, dass die unterschiedlichen Reaktionsverläufe zu einer deutlichen Veränderung der Produktverteilungen und nicht nur des mittleren DS führt.

Bei den BWLs sind die Unterschiede der Molekulargewichtsverteilungen der einzelnen Gradientenfractionen verglichen mit Avicels weniger stark ausgeprägt. Lediglich die ersten vier Fraktionen der BWL 1, die ersten drei Fraktionen der BWL 2, die ersten zwei Fraktionen der BWL 3 und die erste Fraktion der BWL 4 zeigen Verschiebungen der SEC-Chromatogramme zu höheren Elutionsvolumen, also zu kleineren Molekulargewichten, und gleichzeitig etwas engere Peaks, was mit dem Modell übereinstimmt. Bei den mittleren Fraktionen erkennt man sowohl eine nahezu identische Lage des Peakmaximums, als auch ähnliche Peakbreiten, was auf das gleiche Molekulargewicht dieser Fraktionen hinweist (stimmt ebenso mit dem Modell überein). Allerdings können die engeren Peaks bei einer



gleichbleibenden Peaklage bei den letzten Fraktionen von BWL 1 – BWL 4 mit dem Modell nicht erklärt werden. Offensichtlich spielt hierbei ein anderer Parameter eine Rolle. Bei den Proben BWL 6 und Rad 67 werden im gesamten Gradientenbereich nahezu keine Veränderungen in der Lage der SEC-Peakmaxima der unterschiedlichen Fraktionen beobachtet. Somit stimmt das Verhalten der ersten Fraktionen dieser Probe nicht mit den anderen BWL-Proben und nicht mit dem Modell überein. Zusätzlich können bei diesen Proben die geringeren Peakbreiten bei den letzten Gradientenfraktionen nicht mit dem vorgeschlagenen Modell erklärt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die erhaltenen Ergebnisse darauf hinweisen, dass die niedermolekularen Avicels eine stärkere Molmassenabhängigkeit in der Gradientenchromatographie aufweisen als die hochmolekularen BWLs, was auch erwartet wurde. Für BWLs würde dies bedeuten, dass die chemische Zusammensetzung (DS) den dominierenden Trennfaktor in der Gradientenchromatographie darstellt. Folglich beschreiben die im Kapitel 4.2 berechneten DS-Verteilungen bei diesen Proben tatsächlich nur die chemische Heterogenität der Proben. Bei den niedermolekularen Avicels hingegen spielt die Molmasse in der Gradiententrennung höchstwahrscheinlich eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Die in Kapitel 4.2 berechneten DS-Verteilungen resultieren somit aus überlagerten Effekten der chemischen und der Molmassenheterogenität. Die Proben Avicel 5 und BWL 6 zeigen ein vom Modell und anderen Avicels bzw. BWLs abweichendes Verhalten, was auf die probenspezifischen strukturellen Besonderheiten zurückgeführt werden muss, die wahrscheinlich aus der zweistufigen Synthese resultieren. Zusätzlich wurden Hinweise darauf erhalten, dass für BWLs keine Abhängigkeit der Molekulargewichtsverteilung vom DS existiert, was gleichzeitig bedeutet, dass bei der Synthese keine Kettenlängen bevorzugt substituiert werden.

Die Ergebnisse einer 2D chromatographischen Trennung können auch als Konturplots dargestellt werden, wie das in Abb. 64 exemplarisch für Avicel 3 und BWL 3 gezeigt ist. Hierbei wurde als y-Achse das Elutionsvolumen in der Gradientenchromatographie gewählt und auf der x-Achse das Elutionsvolumen in der SEC aufgetragen. Die auf das Maximum normierten ELSD-Signalintensitäten, die in der ersten Näherung zu den Konzentrationen der eluierenden Fraktionen proportional sind, wurden farbkodiert wiedergegeben. Dabei nimmt die Konzentration von blau nach gelb zu (siehe die Farbskala auf der rechten Seite des Plots).

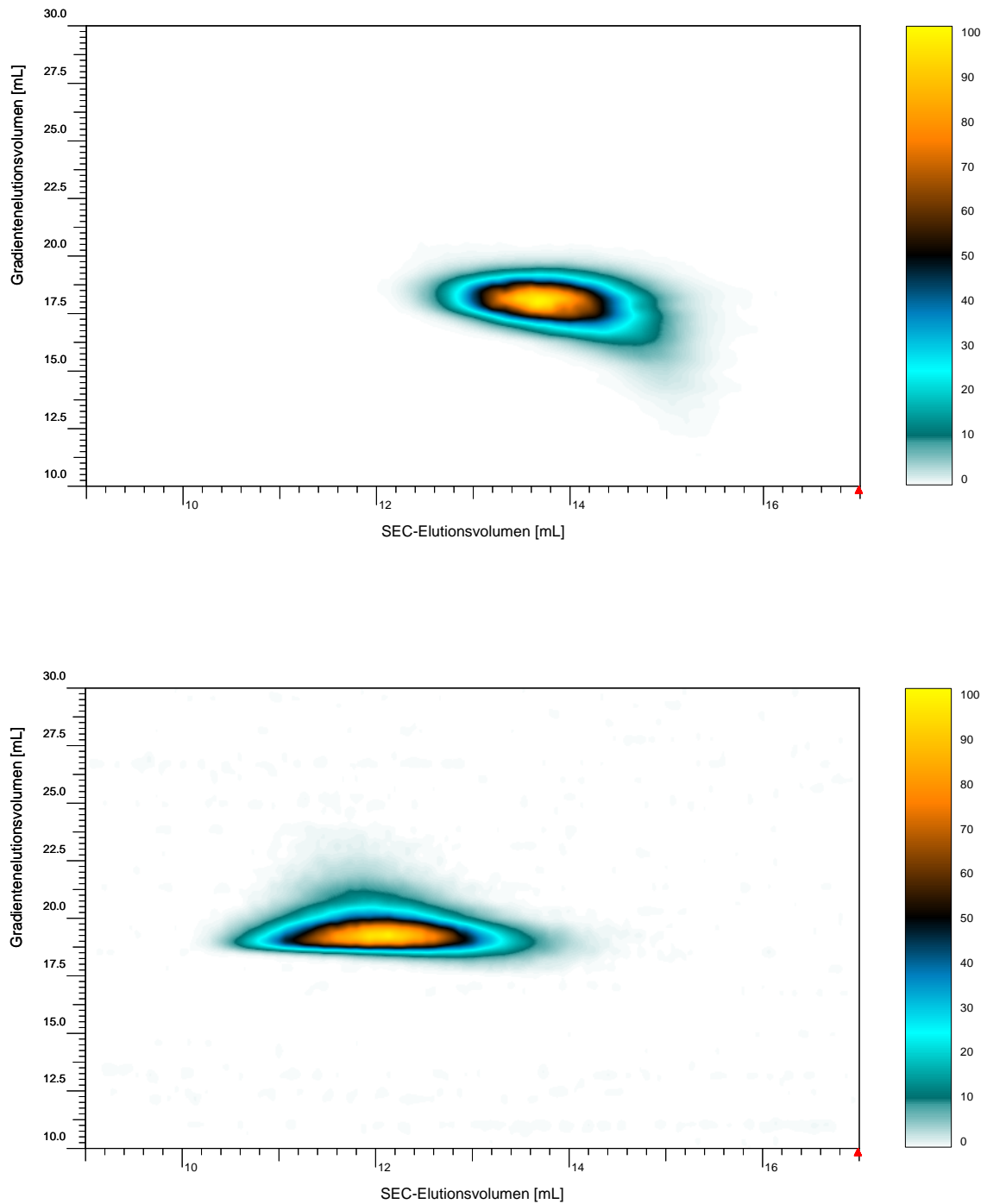


Abb. 64: Konturplots der 2D chromatographischen Trennungen der Proben Avicel 3 (oben) und BWL 3 (unten).

In den Konturplots in Abb. 64 wird für jede Probe lediglich nur ein Maximum detektiert, woraus deutlich wird, dass es sich bei diesen Proben nicht z.B. um Polymerblends handelt. Da sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension breite Peaks resultieren, wird ersichtlich, dass die Proben sowohl bezüglich der chemischen Zusammensetzung als auch bezüglich des Molekulargewichtes heterogen sind. Für Avicel 3 lässt sich im Bereich der

kleinen Molmassen ein leichtes Fronting zu kleineren Gradientenelutionsvolumen erkennen, für BWL 3 wird ein leichtes Tailing zu den höheren Gradientenelutionsvolumen im Bereich der mittleren Molmassen detektiert. Die feinen Unterschiede der Molekulargewichtsverteilungen der einzelnen Gradientenfraktionen, auf die ausführlich bei der Beschreibung der Abb. 61 und Abb. 62 eingegangen wurde, bleiben bei der Darstellung der Ergebnisse als Konturplot aufgrund der gleichzeitig auftretenden Konzentrationsunterschiede der einzelnen Fraktionen verborgen. Somit kann man schlussfolgern, dass mittels der Konturplots lediglich recht grobe Unterschiede zwischen den Fraktionen detektiert werden können. Für eine detailliertere Betrachtung ist der Vergleich der normierten SEC-Chromatogramme besser geeignet.

#### *Zweidimensionale Trennungen der Probenmischungen*

Wie oben gezeigt wurde, kann die 2D flüssigchromatographische Kopplung der Gradientenchromatographie mit der SEC zur Untersuchung der Molmassenabhängigkeit in der Gradientenchromatographie eingesetzt werden. Gleichzeitig können Korrelationen zwischen dem DS und der Molmasse für individuelle NaCMC-Proben untersucht werden. Der wesentliche Vorteil der 2D-Chromatographie liegt jedoch in der Dekonvolution komplexer Verteilungen, deren Komponenten mit eindimensionalen Trennverfahren nicht oder nicht effizient genug zu trennen sind. Um das für Cellulosederivate zu belegen befasst sich der nächste Teil dieses Kapitels mit der Trennung von NaCMC-Blends, die sich in DS und Molekulargewicht unterscheiden.

Hierzu wurden NaCMC-Mischungen aus Proben mit unterschiedlichen DS-Werten und Molmassen hergestellt. Für diese wurde erwartet, dass die Gradientenchromatographie, die überwiegend nach DS trennt, Blendkomponenten, die ähnliche DS-Werte und unterschiedliche Molmassen besitzen, nicht effektiv genug trennen kann. Im Gegensatz dazu kann die SEC, die nach der Molmasse trennt, nicht die Komponente von Blends trennen, die gleiche Molmassen aber unterschiedliche DS-Werte besitzen. In einer aus gleichen Anteilen Avicel 3, BWL 3 und BWL 4 bestehende Probenmischung, besitzen Avicel 3 und BWL 3 nahezu gleiche DS-Werte, aber unterschiedliche Molmassen und könnten vermutlich in der SEC voneinander getrennt werden. Hingegen sollten BWL 3 und BWL 4, die unterschiedliche DS-Werte aber nahezu gleiche Molmassen besitzen, in der SEC coeluieren. Sie sollten sich jedoch in der Gradientenchromatographie aufgrund unterschiedlicher DS-Werte voneinander

unterscheiden lassen. Hier sollten jedoch Avicel 3 und BWL 3 aufgrund ähnlicher DS-Werte ähnliche Elutionsvolumen besitzen. Folglich sollte keine der beiden eindimensionalen Methoden die Mischung in alle Bestandteile trennen. Dies wird durch die in Abb. 65 dargestellten Chromatogramme bestätigt.

Im Chromatogramm der Gradiententrennung (links) werden zwei Peakmaxima, im SEC-Chromatogramm (rechts) ein breiter Peak mit einer Schulter detektiert. Anhand dieser Chromatogramme lassen sich somit nur zwei Komponenten in der Mischung vermuten. Zudem lässt sich nicht zuordnen, welcher der Komponenten der Gradientenchromatographie die Schulter in SEC zugeordnet werden sollte. Wie erwartet, kann die tatsächliche Zusammensetzung des Blends durch die eindimensionalen Trennverfahren nicht aufgeklärt werden.

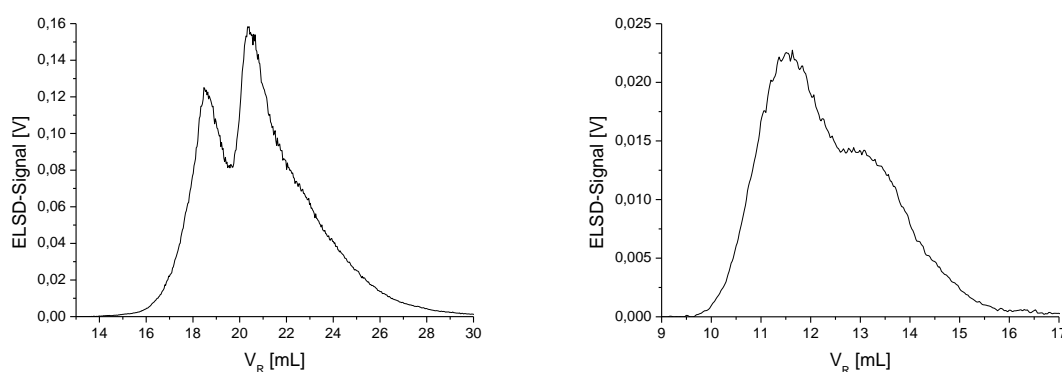


Abb. 65: Chromatogramme der Gradienten- (links) und der SEC-Trennung (rechts) einer Mischung aus gleichen Anteilen Avicel 3 ( $DS = 0.98$ ,  $M_w = 39\,000\text{ g/mol}$ ), BWL 3 ( $DS = 0.95$ ,  $M_w = 386\,000\text{ g/mol}$ ) und BWL 4 ( $DS = 1.25$ ,  $M_w = 481\,000\text{ g/mol}$ ). Gesamtkonzentration:  $1.5\text{ g/L}$ . Mischung gelöst jeweils im Eluenten am Anfang des Experimentes. Links: Injektionsvolumen  $5 \times 100\text{ }\mu\text{L}$ . Rechts: Injektionsvolumen  $80\text{ }\mu\text{L}$ .

Das Chromatogramm der 2D-Trennung der Probenmischung ist in Abb. 66 wiedergegeben. Im Konturplot können zwei Bereiche unterschieden werden (umkreist), die zunächst auf zwei Komponenten in der Mischung hinweisen. Darüberhinaus wird offensichtlich, dass der Peak 1 entlang der x-Achse sehr breit ist, was zusätzlich vermuten lässt, dass diese Komponente sehr breit bezüglich ihres Molekulargewichtes verteilt ist oder dass es sich beim Peak 1 nicht um eine sondern um zwei Komponenten gleicher chemischer Zusammensetzung und deutlich unterschiedlicher Molmassen handelt. Der Plot zeigt deutlich, dass die Mischung sowohl bezüglich DS als auch bezüglich der Molmasse heterogen ist und es können Aussagen über die Molmassen der Komponenten unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung getroffen

werden. Folglich erhält man mittels der 2D-Kopplung im Vergleich zu den eindimensionalen Methoden einen Informationsgewinn zur tatsächlichen Zusammensetzung der Probe.

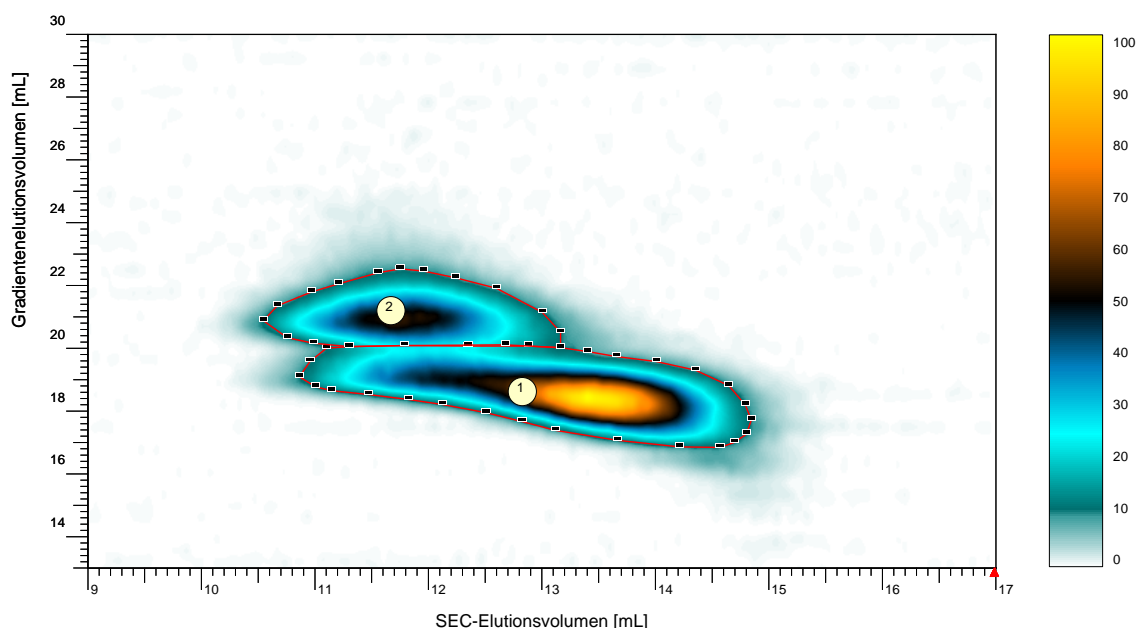


Abb. 66: Konturplot der Probenmischung aus Avicel 3 (DS = 0.98,  $M_w$  = 39 000 g/mol), BWL 3 (DS = 0.95,  $M_w$  = 386 000 g/mol) und BWL 4 (DS = 1.25,  $M_w$  = 481 000 g/mol). Probe gelöst im Eluenten am Anfang des Gradienten. Die roten Linien zeigen die Grenzen der einzelnen Komponenten.

Die quantitative Auswertung eines Konturplots erfolgt basierend auf dem Peakvolumen, wobei angenommen wird, dass dieser Parameter proportional zur Massenkonzentration der jeweiligen Komponente ist. Somit können die Massenanteile der Mischungskomponenten bestimmt werden, indem die Peakvolumen miteinander ins Verhältnis gesetzt werden. Dazu müssen zunächst die Peakgrenzen gesetzt werden. Dies ist erschwert, wenn die Peaks nicht basisliniengetrennt sind (in Abb. 66 der Fall), wodurch die Ergebnisse beeinflusst werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das 2D-Chromatogramm der Probenmischung in Abb. 66 auf zwei unterschiedliche Weisen quantitativ ausgewertet. Zum einen wurden die Peakgrenzen wie in Abb. 66 gezeigt gesetzt, womit angenommen wurde, dass die Mischung aus zwei Komponenten besteht (Auswertung 1). Zum anderen wurde die Komponente 1 bei einem SEC-Elutionsvolumen von ca. 12.7 mL in zwei Komponenten (Komponente 1<sub>links</sub> und Komponente 1<sub>rechts</sub>) aufgeteilt, womit angenommen wurde, dass die Mischung insgesamt aus drei Komponenten besteht (Auswertung 2). Die Massenanteile der einzelnen Komponenten,

die bei den beiden Auswertungen resultierten, sowie die theoretischen Massenanteile, die sich aus der Einwaage ergeben, sind in Tab. 12 angegeben.

Die Massenanteile der Komponenten 1 und 2 bei der Auswertung 1 (wenn von einer zwei-Komponenten-Mischung ausgegangen wird) stimmen gut mit den theoretischen Werten überein. Dagegen führt die Auswertung 2, wenn Peak 1 in zwei Bereiche, die jeweils einer Komponente entsprechen, aufgeteilt wird, zu deutlich von den theoretischen Werten abweichenden Gewichtsanteilen genau für diese Komponenten ( $1_{\text{links}}$  und  $1_{\text{rechts}}$ ). Dies kann auf die erhebliche Überlagerung der beiden Peaks  $1_{\text{links}}$  und  $1_{\text{rechts}}$  zurückgeführt werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass wenigstens für die Komponente 2 (mit höherem DS) und die Komponente 1 als Ganzes (mit kleinerem DS), also für die Komponenten ohne starke Überlagerung, mittels 2D-Chromatographie korrekte Massenanteile ermittelt wurden.

Tab. 12: Experimentelle Massenanteile der einzelnen Mischungskomponenten, die aus dem Konturplot in Abb. 66 resultierten, wobei zwei unterschiedliche Auswertungen vorgenommen wurden (siehe Text). Zusätzlich sind die aus den Einwaagen erwarteten Gewichtsanteile der Probenmischung angegeben.

Komponente	1		2 (BWL 4)
	$1_{\text{links}}$ (Avicel 3)	$1_{\text{rechts}}$ (BWL 3)	
Massenanteil bei Auswertung 1 [%]	69		31
Massenanteil bei Auswertung 2 [%]	20	49	31
Theoretischer Massenanteil [%]	66		33
	33	33	

Dagegen zeigt das Gradientenchromatogramm der Mischung in Abb. 65 vollkommen andere Peaksverhältnisse. Es wird ein intensiverer Peak für die später eluierende Komponente mit höherem DS als für die früher eluierende Komponente mit kleinerem DS detektiert, was im Falle einer quantitativen Auswertung dieses Chromatogramms zu den falschen Massenanteilen führen würde. Der genaue Grund für diese Abweichungen im eindimensionalen Gradienten konnte leider nicht ermittelt werden.

Das Potential der 2D-Trennung komplexer NaCMC-Mischungen wird beispielhaft an einer weiteren Mischung belegt, deren Konturplot in Abb. 67 dargestellt ist. Hier wurden vier

NaCMCn (Avicel 1, Avicel 4, BWL 2, BWL 4) gemischt und anschließend mittels 2D-Chromatographie untersucht.

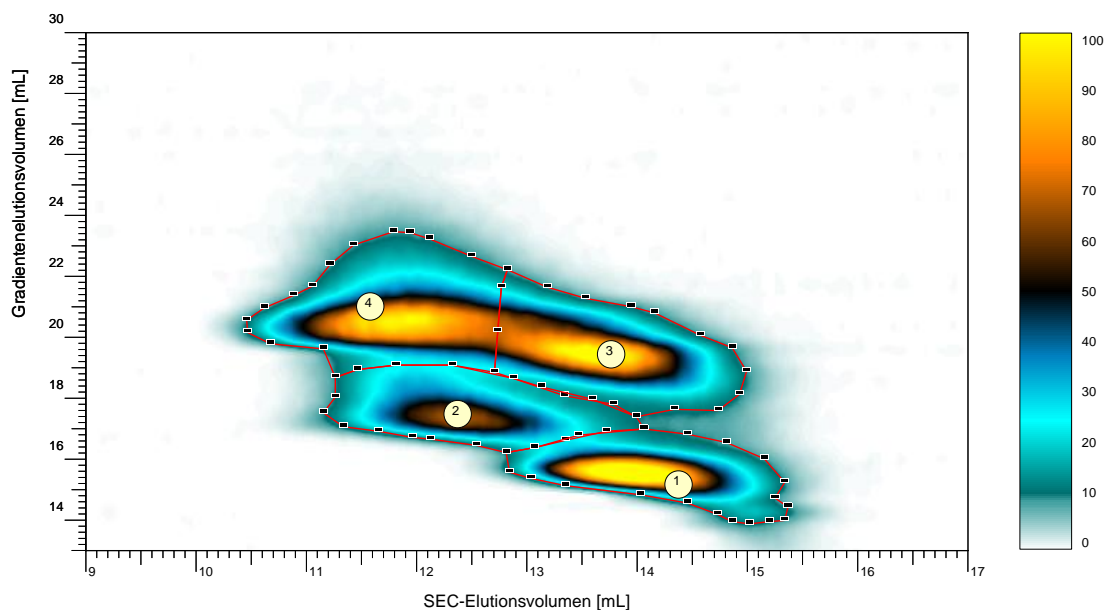


Abb. 67: Konturplot einer Mischung bestehend aus Avicel 1 ( $DS = 0.45$ ,  $M_w = 392\,000\text{ g/mol}$ ), Avicel 4 ( $DS = 1.23$ ,  $M_w = 42\,000\text{ g/mol}$ ), BWL 2 ( $DS = 0.73$ ,  $M_w = 341\,000\text{ g/mol}$ ) und BWL 4 ( $DS = 1.25$ ,  $M_w = 481\,000\text{ g/mol}$ ). Die Konzentrationen der Avicelkomponenten lag bei  $0.45\text{ g/L}$ , die der BWL bei  $0.75\text{ g/L}$ .

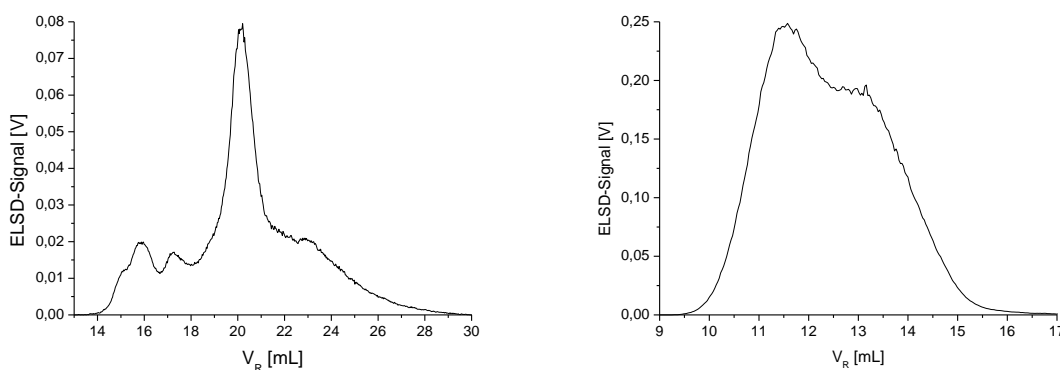


Abb. 68: Chromatogramme der Gradienten- (links) bzw. SEC-Trennung (rechts) der Mischung aus Abb. 67 bestehend aus Avicel 1, Avicel 4, BWL 2 und BWL 4. Konzentrationen der Avicels je  $0.45\text{ g/L}$ . Konzentrationen der BWLs je  $0.75\text{ g/L}$ . Links: Injektionsvolumen  $100\text{ }\mu\text{L}$ . Rechts: Injektionsvolumen  $80\text{ }\mu\text{L}$ .

In diesem Beispiel können klar vier unterschiedliche Peaks identifiziert werden, die auf die vier unterschiedlichen Komponenten in der Mischung hinweisen. Diese Peaks wurden eingekreist und numeriert. Es lassen sich Aussagen über die Molmassen der Komponenten unterschiedlicher DS-Werte treffen. Wenn diese Mischung dagegen nur mit SEC untersucht wird, dann kommt es jeweils zur Coelution der Komponenten 1 und 3 bzw. 2 und 4 aufgrund

ihrer ähnlicher Molmassen (siehe Abb. 68, rechts). Im Gradienten (Abb. 68, links) lassen sich zwar vier Komponenten vermuten, allerdings sind die Peaks stark überlagert und man erhält keine Informationen über ihre Molmassen.

Die quantitative Auswertung des Konturplots dieser Mischung wurde anhand der Peakvolumina der in Abb. 67 definierten Peaks vorgenommen. Die erhaltenen Massenanteile zusammen mit den theoretischen Massenanteilen, die aus der Einwaage resultieren, sind in Tab. 13 angegeben.

Für die Komponenten 1 und 4 werden die korrekten Massenanteile in der quantitativen Auswertung des Konturplots erhalten. Für die Komponenten 2 und 3 dagegen werden signifikant abweichende Werte erhalten. Dies kann mit Sicherheit auf die starke Überlagerung der Peaks dieser Komponenten mit den drei anderen Bestandteilen der Mischung zurückgeführt werden. Ein weiterer Grund für die falschen Massenanteile könnte die Nichtlinearität des ELSD-Signales sein. Es kann also festgestellt werden, dass aus dem Konturplot eines NaCMC-Blends die richtigen Massenverhältnisse für die Komponenten nur dann erhalten werden können, wenn keine starke Überlagerung dieser Komponenten auftritt. Dagegen würden in der eindimensionalen Gradientenchromatographie (Abb. 68, links) für alle Bestandteile vollkommen falsche Massenanteile resultieren.

Tab. 13: Experimentelle Massenanteile der einzelnen Mischungskomponenten, die aus dem Konturplot in Abb. 67 resultierten, sowie die theoretischen Massenanteile für diese Probenmischung aus der Einwaage.

Komponente	1 (Avicel 1)	2 (BWL 2)	3 (Avicel 4)	4 (BWL 4)
Experimenteller Massenanteil [%]	20	18	30	32
Theoretischer Massenanteil [%]	19	30 <sup>1</sup>	19	32

1: bei der Komponente 2 (BWL 2) wurde der Filtrationsverlust von 7 % mitberücksichtigt.

Die Untersuchungen zur zweidimensionalen Chromatographie haben gezeigt, dass die 2D-Chromatographie Trennungen komplexer NaCMC-Mischungen erlaubt, die sich mit eindimensionalen Trennverfahren nicht vollständig charakterisieren lassen.



## **5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN**

Natriumcarboxymethylcellulosen (NaCMCn) besitzen einen sehr komplexen molekularen Aufbau. Daher stellt ihre Charakterisierung hohe Anforderungen.

Die Komplexität ist vor allem dadurch bedingt, dass in den genannten Polymeren mehrere Ebenen der chemischen sowie die Molekulargewichtsheterogenität gleichzeitig auftreten, die unabhängig voneinander bzw. miteinander korreliert einen Einfluss auf die Produkteigenschaften ausüben. Deswegen ist es wichtig sowohl alle Heterogenitätsarten unabhängig voneinander als auch deren Korrelationen zu charakterisieren. Viele bis jetzt etablierte analytische Methoden basieren auf einem partiellen bzw. vollständigen Kettenaufbau. Dies führt dazu, dass mittels dieser Methoden vor allem die chemische Heterogenität erster Ordnung (Substituentenverteilung über die Ketten) und zweiter Ordnung (Substituentenverteilung entlang der Ketten) nicht voneinander unterschieden werden können. Die bisher verfolgten Ansätze, die intakte Ketten untersuchen, konnten die genannten Aufgaben noch nicht zufriedenstellend lösen.

In vorliegender Arbeit wurde ein neuartiger Ansatz zur Untersuchung der chemischen Heterogenität von intakten NaCMCn verwendet. Mittels Wechselwirkungschromatographie (Gradientenchromatographie) auf einer Umkehrphase, die aus mit Pentafluorophenylpropylgruppen modifiziertem Silikagel besteht, konnten intakte NaCMCn mit DS-Werten 0.45 – 1.55 nach ihren chemischen Zusammensetzungen (DS-Werten) getrennt werden. Unter Verwendung eines Gradienten von Wasser nach Methanol konnten pH-abhängige Trennungen erhalten werden. Die pH-Abhängigkeit resultierte höchstwahrscheinlich daraus, dass die Stärke der Wechselwirkungen der Carboxymethylsubstituenten mit der stationären Phase durch den pH-Wert der mobilen Phase verändert wurde. Ihre Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden umso stärker, je kleiner der pH-Wert der mobilen Phase ist. Bei hohen pH-Werten, bei denen die Carboxymethylsubstituenten keinen bzw. nur geringen Beitrag zur Retention liefern, wurde die beobachtete Retention nur auf die Wechselwirkungen unsubstituierter Hydroxylgruppen mit der stationären Phase zurückgeführt. Daher kehrt sich die Elutionsreihenfolge der Proben mit unterschiedlichen DS-Werten bei hohen und kleinen pH-Werten um. Zudem wurde ein leichter Einfluss der Molmasse auf die Retention festgestellt.

Die Trennung intakter NaCMCn nach DS konnte mittels semi-online Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie exemplarisch an technischen Proben eindeutig nachgewiesen werden. Dabei wurde das Problem der schichtdickenabhängigen Bandenflächenverhältnisse in FTIR-Spektren erfolgreich durch eine rechnerische Korrektur des Schichtdickenbeitrages auf das Bandenflächenverhältnis gelöst. Zudem konnte das Problem des Gegenionenaustausches zwischen den Polymerketten und dem Puffer während des chromatographischen Prozesses umgangen werden. Durch den Gegenionenaustausch verändert sich während des chromatographischen Experimentes die chemische Struktur der CMCn, so dass eine Kalibration auf Basis der Ausgangsmaterialien nicht erfolgreich ist.

Versuche zum Nachweis der Trennung intakter NaCMCn nach DS mittels offline Kopplung der Gradientenchromatographie mit der HPLC nach vollständigem Kettenabbau, scheiterten dagegen. Es wurde festgestellt, dass der in den Gradientenfraktionen enthaltene Puffer aus der Gradientenchromatographie den „normalen“ Ablauf des hydrolytischen Kettenabbaus, welcher ohne Anwesenheit des Puffers stattfindet, stört. Es wurde versucht den Puffer aus den Gradientenfraktionen durch thermische Behandlung vor der Hydrolyse zu entfernen. Dies scheiterte allerdings wahrscheinlich daran, dass es entweder keine vollständige Eliminierung des Puffers erzielt werden konnte oder es während der thermischen Behandlung zu Veränderungen am Polymeren kam.

Basierend auf den Gradientenchromatogrammen konnten die DS-Verteilungen individueller Proben berechnet werden, wobei bedingt durch den leichten Molmasseneinfluss auf die Retention Kalibrierkurven für hoch- und niedermolekulare Proben separat erstellt wurden. Es wurde festgestellt, dass Proben, die durch eine zweistufige Synthese hergestellt wurden, verglichen mit den in nur einem Schritt synthetisierten Proben, abweichende Formen der bestimmten DS-Verteilungskurven besitzen. Die auf der Basis der DS-Verteilungen ermittelten DS-Standardabweichungen wurden als Maß für die chemische Heterogenität erster Ordnung der Proben berechnet. Es konnte festgestellt werden, dass die chemische Heterogenität erster Ordnung der niedermolekularen auf Avicel-Cellulose basierenden Proben im untersuchten DS-Bereich nicht vom mittleren DS-Wert abhängt. Hingegen nimmt die chemische Heterogenität erster Ordnung der hochmolekularen auf Baumwolllinters basierenden Proben mit steigendem mittlerem DS-Wert ab. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die resultierten Abhängigkeiten der DS-Standardabweichung vom DS nicht mit dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen statistischen Modell übereinstimmen.

Weiterhin wurde eine Methode der Größenausschlusschromatographie entwickelt, die den Anforderungen der 2D-chromatographischen Methode unter Verwendung eines ELSDs (evaporative light scattering detector) zur Detektion entspricht. Eine wässrige Ammoniumacetatlösung wurde als verdampfbare mobile Phase eingesetzt. Da weder geeignete Kalibrierstandards für eine konventionelle Kalibration noch die Mark-Houwink-Koeffizienten von NaCMCn in der verwendeten mobilen Phase für eine universelle Kalibration fehlten, wurden die absoluten Molmassen der Proben mit einem MALLS-Detektor (multi angle laser light scattering detector) bestimmt. Die erhaltenen Kalibrierkurven zeigten keine DS-Abhängigkeit, was die Möglichkeit bietet, NaCMCn unabhängig von ihren DS-Werten mit der gleichen Kalibrierkurve zu untersuchen. Durch Kalibration unter Verwendung breitverteilter Standards wurden Korrekturfaktoren ermittelt, die es erlauben eine auf Pullulan basierende Kalibrierkurve in eine für NaCMCn geeignete Kalibrierkurve umzurechnen. Ein abweichendes Verhalten niedrig substituierter NaCMCn (Avicel 1, Avicel 2, BWL 2) verglichen mit höher substituierten NaCMCn wurde festgestellt, was auf ihr Aggregationsverhalten zurückgeführt wurde. Die erhaltene kleinere mittlere Molmasse der höchstsubstituierten auf Baumwolllinters basierenden NaCMCn (BWL 6) verglichen mit anderen NaCMCn derselben Reihe wurde auf die zweistufige Synthese zurückgeführt. Das Skalierungsverhalten des Trägheitsradius mit dem Molekulargewicht belegte die von DS unabhängige Struktur eines ausgedehnten Knäuels in der verwendeten mobilen Phase.

Schließlich wurden die entwickelten Methoden der Gradientenchromatographie und der Größenausschlusschromatographie online miteinander gekoppelt. Damit konnten Informationen über die Molekulargewichtsabhängigkeit in der Gradientenchromatographie und über die Korrelation zwischen dem Molekulargewicht und DS in den untersuchten Proben gewonnen werden. Es gab Hinweise, dass die niedermolekularen auf Avicel-Cellulose basierenden NaCMCn eine stärkere Molmassenabhängigkeit in der Gradientenchromatographie verglichen mit den hochmolekularen auf Baumwolllinters basierenden Proben aufweisen. Für die hochmolekularen Proben bedeutet das, dass die chemische Zusammensetzung (DS) den dominierenden Trennfaktor in der Gradientenchromatographie darstellt und dass die berechneten DS-Verteilungen überwiegend die chemische Heterogenität der Proben beschreiben. Bei den niedermolekularen Proben dagegen zeigen die berechneten DS-Verteilungen überlagerte Effekte aus DS und Molmasse. Die höchstsubstituierte niedermolekulare Probe (Avicel 5) zeigte ein etwas abweichendes

Verhalten verglichen mit den anderen Proben dieser Reihe, was auf die probenspezifischen strukturellen Besonderheiten zurückgeführt wurde, die wahrscheinlich aus der zweistufigen Synthese resultieren. Zusätzlich gab es Hinweise, dass bei hochmolekularen Proben keine Korrelation zwischen dem Molekulargewicht und DS existiert, was gleichzeitig bedeutet, dass bei der Synthese dieser Proben keine Kettenlängen bevorzugt substituiert werden.

Zusätzlich konnten mittels der entwickelten 2D-Methode komplexe sowohl bezüglich DS als auch bezüglich der Molmasse heterogene NaCMC-Mischungen qualitativ und halbquantitativ getrennt werden, was unter Verwendung eindimensionaler Methoden nicht möglich war.

## 6 EXPERIMENTELLER TEIL

### 6.1 Allgemeines über Proben und andere verwendete Stoffe

Vollentsalztes Wasser wurde durch Entsalzung mittels eines Wasseraufbereitungssystems Milli-Q Simplicity 185 (Millipore, Darmstadt, Deutschland) oder für das Kapitel zur Hydrolyse (Kapitel 4.3.1) durch Entsalzung mittels eines Mischbett-Wasservollentsaltzers TKA DI 2000 (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH) erhalten.  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und Methanol wurden von VWR (Haasrode, Belgien) geliefert. Essigsäure und Natriumacetat wurden von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.  $\text{NaCl}$  wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) gekauft.  $\text{HClO}_4$  (70 % im Wasser) und  $\text{KOH}$  (Plätzchen, chem. rein) wurden von Acros Organics (Geel, Belgium) bzw. Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH (Seelze, Deutschland) bezogen.

Die technischen Proben Rad 79, Rad 62, Rad 80, Rad 78 und Rad 67 wurden von Dow Wolff Cellulosics GmbH (Walsrode, Deutschland), Probe 1, Probe 2 und Probe 3 von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt bzw. bezogen. Die Laborproben (Modellproben) Avicel und BWL wurden im Arbeitskreis Prof. Dr. Heinze an der Universität Jena wie im Folgenden beschrieben synthetisiert.

#### *Probenherstellung*

Die Synthese von Avicel 1-4 und BWL 1-4 verlief bei allen Proben auf die gleiche Weise, wobei lediglich die Menge des zugesetzten Natriummonochloracetats variiert wurde. Zunächst wurden 5 g der Avicel-Cellulose bzw. der Baumwolllinters für 20 min in 150 mL Isopropanol suspendiert. Danach wurden innerhalb von 1 h unter Rühren 13.3 mL 15 % (w/v) wässriger  $\text{NaOH}$ -Lösung bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde Natriummonochloracetat zugesetzt (die Mengen sind in Tab. 14 aufgeführt) und 5 h bei 55 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff durch Filtration abgetrennt, in 300 mL Methanol/Wasser 80/20 (v/v) suspendiert und mit verdünnter Essigsäure neutralisiert. Der Feststoff wurde erneut abgetrennt, drei Mal mit Ethanol/Wasser 80/20 (v/v) und anschließend mit reinem Ethanol gewaschen. Der Feststoff wurde bei 40 °C im Vakuum getrocknet. Die Substitutionsgrade der Proben wurden durch HPLC nach vollständigem Kettenabbau bestimmt.

Tab. 14: Mengen des zugesetzten Natriummonochloracetats für die Synthese der Laborproben Avicel und BWL.

Probe	DS	Menge des Natriummonochloracetats [g]
Avicel 1 / BWL 1	0.45 / 0.46	1.85
Avicel 2 / BWL 2	0.75 / 0.73	2.78
Avicel 3 / BWL 3	0.98 / 0.95	3.80
Avicel 4 / BWL 4	1.23 / 1.25	5.50
Avicel 5 / BWL 6	1.54 / 1.55	1.85 + 3.40 / 1.80 + 3.80

Für die Herstellung von Avicel-Proben mit höheren Substitutionsgraden als  $DS = 1.35$  wurde an der Probe Avicel 1 eine weitere Umsetzung vorgenommen. Hierzu wurde 5 g Avicel 1 in 150 mL Isopropanol suspendiert, mit 13.3 mL 15 % (w/v) wässriger NaOH-Lösung und anschließend mit 3.40 g Natriummonochloracetat versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 55 °C und der beschriebenen Aufarbeitung erhielt man das Produkt Avicel 5 mit  $DS = 1.54$ .

Für die Herstellung von BWL-Proben mit höheren Substitutionsgraden als  $DS = 1.35$  wurde die Carboxymethylierung ebenfalls ein zweites Mal durchgeführt. Zunächst wurde mittels der für BWL 1-4 beschriebenen Synthese unter Verwendung 1.80 g Natriummonochloracetat ein Produkt mit  $DS = 0.46$  erhalten. Dieses wurde unter vergleichbaren Bedingungen erneut carboxymethyliert. Hierzu wurden 5 g in 150 mL Isopropanol suspendiert, mit 13.3 mL der 15 % (w/v) wässrigen NaOH und 3.80 g Natriummonochloracetates versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 55 °C und anschließender Aufarbeitung wurde das Produkt BWL 6 mit  $DS = 1.55$  erhalten.

#### *Probencharakterisierung durch die Hersteller*

Die mittleren Substitutionsgrade (DS) wurden von der jeweiligen Bezugsquelle genannt. Für die Laborproben Avicel und BWL erfolgte die DS-Bestimmung mittels HPLC nach vollständigem Kettenabbau [28]. Für die anderen Proben war die Methode zur DS-Bestimmung unbekannt. Die DS-Werte sind in Tab. 15 zusammen mit den Angaben zu den mittleren Molmassen bzw. Viskositäten angegeben.

Tab. 15: DS, Molmassen und Viskositäten der Proben, die von jeweiligen Herstellern bestimmt wurden.

Probe	DS	Molmasse bzw. Viskosität
Laborproben		
Avicel 1	0.45	-
Avicel 2	0.75	-
Avicel 3	0.98	-
Avicel 4	1.23	-
Avicel 5	1.54	-
BWL 1	0.46	-
BWL 2	0.73	-
BWL 3	0.95	-
BWL 4	1.25	-
BWL 6	1.55	-
Technische Proben		
Rad 79	0.7	2000 mPas
Rad 62	0.9	2000 mPas
Rad 80	1.2	2000 mPas
Rad 78	0.9	10 mPas
Rad 67	0.8-0.9	4535 mPas
Probe 1	0.7	90 000 g/mol, 19 mPas
Probe 2	0.7	250 000 g/mol, 863 mPas
Probe 3	1.2	250 000 g/mol, 451 mPas

## 6.2 SEC-MALLS

SEC und SEC-MALLS-Experimente wurden auf einem TOSOH Bioscience (Tokyo, Japan) EcoSEC Micro-SEC-System mit eingebautem RI-Detektor, bei welchem ein DAWN DSP MALLS-Detektor (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) zwischen der Säule und dem RI-Detektor installiert wurde, durchgeführt. Für die Datenaufnahme und Auswertung wurde zum einen PSS WINGPC-Unity Version 7.0 (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz,

Deutschland) und zum anderen ASTRA Version 4.90.08 (Wyatt Technology, USA) verwendet.

Der MALLS-Detektor wurde mit reinem Toluol kalibriert, wobei ein Rayleighverhältnis von  $9.78 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$  bei 690 nm angenommen wurde. Die Konstante des RI-Detektors wurde unter Verwendung von Dextran und Pullulan in reinem Wasser bestimmt, wobei für die beiden Polymerarten ein Brechungsindexinkrement ( $dn/dc$ ) von 0.145 mL/g angenommen wurde (dieser Wert wurde von PSS Standards Service, Deutschland, mitgeteilt). Die Unterschiede zwischen den Wellenlängen der beiden Detektoren wurden ignoriert.

Für die SEC-Trennungen wurde ein Säulensatz bestehend aus Suprema 10  $\mu\text{m}$   $10^4 \text{ \AA}$  (Dimensionen 8 mm x 300 mm), Suprema 10  $\mu\text{m}$   $30 \text{ \AA}$  (Dimensionen 8 mm x 150 mm) und einer Vorsäule Suprema 10  $\mu\text{m}$   $30 \text{ \AA}$  (PSS Standards Service, Mainz, Deutschland) bei einer Flussrate von 1 mL/min und einer Säulentemperatur von 35 °C verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 80  $\mu\text{L}$ . Die Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, in 100 mmol/L wässriger NaCl- oder  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit wurde jeweils durch doppelte Injektion geprüft. Die kritische Salzkonzentration im Eluenten wurde unter Verwendung der Säule Suprema 10  $\mu\text{m}$ ,  $10^3 \text{ \AA}$  (Dimensionen 8 mm x 300 mm, PSS Standards Service, Mainz, Deutschland) bestimmt. Die zuletzt genannten Experimente wurden auf einem Agilent 1100 Instrument unter Verwendung eines ELSDs 2100 (siehe Kapitel 6.3) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 100  $\mu\text{L}$ .

Die Filtrationsverluste (Wiederfindungsraten nach der Filtration) wurden für die Laborproben Avicel und BWL zum einem aus rein wässrigen Lösungen und zum anderen aus 100 mmol/L wässrigen NaCl-Lösungen (beide mit einer Probenkonzentration von 1 g/L) gravimetrisch wie folgt bestimmt. In beiden Fällen wurde eine genau eingewogene Probenmenge in reinem Wasser mit einer Konzentration von 1.25 g/L bei 25 °C über Nacht unter Rühren gelöst. Danach wurden die erhaltenen Lösungen mit Wasser bzw. wässriger NaCl-Lösungen (wenn notwendig) versetzt um die Probenkonzentration auf 1 g/L und die Salzkonzentration auf 100 mmol/L zu bringen. Direkt anschließend wurden die Lösungen durch einen Spritzenvorsatzfilter (PALL, Sample Acrodisc® PSF, 25 mm, GxF/0.45  $\mu\text{m}$ , PVDF Membrane) filtriert. Die Lösungen wurden eingedampft und der verbliebene Feststoff wurde bei 50 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Wiederfindung nach der



Filtration wurde als Verhältnis der Massen des getrockneten festen Rückstands zur Anfangsprobenmenge unter Berücksichtigung des festen NaCl berechnet. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Doppelbestimmung überprüft.

Zur Charakterisierung der löslichen und unlöslichen Probenanteile (Filtrate und Retentate) der Proben BWL 1 und BWL 2 wurden diese Proben quantitativ filtriert. Dazu wurden ca. 100 mg der Proben bei 25 °C über Nacht unter Rühren in Wasser mit einer Konzentration 2 g/L gelöst. Die Lösungen wurden durch Faltenfilter (Schleicher & Schuell 595½, 150 mm Diameter) filtriert. Das Filtrat (löslicher Anteil) und das Retentat (unlöslicher Anteil) wurden bei 50 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die DS-Werte der erhaltenen Feststoffe wurden mittels HPLC nach vollständigem Kettenabbau im Arbeitskreis Prof. Dr. Heinze an der Universität Jena bestimmt.

Für die konventionelle SEC-Kalibration (Grundkalibration) wurde ein breiter Pullulanstandard (PSS-mepulb300k, 342 000 g/mol), welcher von der PSS Polymer Standards Service GmbH (Mainz, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Von dieser Probe wurde die kumulative Molmassenverteilung durch PSS mitgeteilt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Probenkonzentrationen in 100 mmol/L wässriger NaCl- oder NH<sub>4</sub>OAc-Lösung verwendet: 3 g/L für Avicels und 0.5 g/L für BWLs. Alle Proben enthielten 0.25 g/L Benzoesäure als internem Standard. Avicels wurden mit einer Konzentration 4.5 g/L, BWLs mit 1.25 g/L bei 25 °C unter Rühren über Nacht in reinem Wasser gelöst. Anschließend wurden den Proben wässrige NaCl- bzw. NH<sub>4</sub>OAc-Lösungen, die Benzoesäure enthielten, zugegeben, um die korrekten Proben-, Salz- und Benzoesäurekonzentrationen zu erhalten. Die resultierenden Lösungen wurden direkt danach durch die Spritzenfilter (PALL, Sample Acrodisc® PSF, 25 mm, GxF/0.45 µm, PVDF Membrane) filtriert. Für die Bestimmung der kritischen Salzkonzentration wurde die Probe Rad 78 in reinem Wasser ohne internen Standard bei 1.25 g/L gelöst und wie oben filtriert.

Die Wiederfindungsraten nach der chromatographischen Trennung wurden auf einem Agilent 1100 Instrument unter Verwendung eines ELSDs 2100 (siehe Kapitel 6.3) durchgeführt. Die Flussrate betrug 1 mL/min und das Injektionsvolumen 80 µL. Die Säule wurde bei Raumtemperatur betrieben. Als Eluent wurde eine 100 mmol/L wässrige NH<sub>4</sub>OAc-Lösung verwendet. Die Untersuchungen wurden an den Proben Avicel 1 und Avicel 5 mit einer Konzentration von 3 g/L und 0.5 g/L, für BWL 1 und BWL 6 nur bei 0.5 g/L durchgeführt.

Hierfür wurden die Proben wie oben beschrieben, jedoch ohne Zugabe von Benzoesäure, im Eluenten präpariert. Um die Zeit der Experimente zu reduzieren und um die Probenkonzentration im Eluat zu erhöhen wurde nur die Säule Suprema 10  $\mu\text{m}$  30 Å (Dimensionen 8 mm x 150 mm) und die Vorsäule verwendet. Für die Bestimmung der Wiederfindungen nach der SEC-Trennung wurde eine definierte Probenmenge auf die Säule injiziert. Ein genau bekanntes Eluatvolumen innerhalb des Elutionsbereiches des polymeren Materials wurde gesammelt. Die theoretische Probenkonzentration in dieser Lösung wurde basierend auf dem gesammelten Volumen und der injizierten Probenmenge berechnet. Die tatsächliche Probenkonzentration wurde bestimmt indem die gesammelte Lösung erneut, jedoch ohne Säule in das chromatographische System injiziert wurde. Die Bestimmung der Probenkonzentration erfolgte unter Verwendung einer Detektorkalibrierkurve, die vorher erstellt wurde, indem bekannte Probenmengen der entsprechenden Probe unter vergleichbaren Bedingungen ohne Säule injiziert wurden. Das Verhältnis der experimentell bestimmten zur theoretisch berechneten Probenkonzentration wurde als Wiederfindungsrate bezogen auf die filtrierte Probe definiert.

### **6.3 Gradientenchromatographie**

Die Gradiententrennungen wurden auf einem Agilent 1100 HPLC Instrument bestehend aus einer quaternären Pumpe (Typ G1311A), einem Degasser (Typ G1322A), einem Autosampler (Typ G1313A) und einem Säulenofen (Typ G1316A) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels eines ELSD 2100 (evaporative light scattering detector) (Polymer Laboratories, Church Stretton, England) unter Verwendung der folgenden Einstellungen: Verdampfungstemperatur 110 °C, Nebulizertemperatur 40°C und Gasflussrate 1.5 SLM. Für die Datenaufnahme und Auswertung wurde PSS WINGPC-Unity Version 7.0 (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Deutschland) verwendet.

Die Gradientenbedingungen, die für die Messungen auf der stationären Phase ZIC-pHILIC (Porendiameter 100 Å, Partikeldurchmesser 5  $\mu\text{m}$ , Dimensionen 20 x 2.1 mm, Vorsäule, SeQuant, Marl, Deutschland) verwendet wurden, sind bei den jeweiligen Abbildungen angegeben. Proben wurden bei einer Konzentration von 2 g/L gelöst und filtriert (Filter siehe SEC). Das Injektionsvolumen betrug beim Gradienten, bei dem Methanol verwendet wurde, 5  $\mu\text{L}$ , die Säulentemperatur 35 °C und die Flussrate 0.5 mL/min. Beim Gradienten, bei dem THF verwendet wurde, betrug das Injektionsvolumen 40  $\mu\text{L}$ , die Säulentemperatur 40°C und

die Flussrate 0.4 mL/min. Die Wiederfindungsratenbestimmung erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie oben für die SEC-Säule, allerdings unter Verwendung der 150 mmol/L wässrigen  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung als isokratischem Eluenten.

Bei Einsatz der stationären Phase Luna PFP(2) (Porendiameter 100 Å, Partikeldurchmesser 5 µm, Dimensionen 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) wurden im Normalfall die folgenden experimentellen Bedingungen verwendet: Flussrate 1 mL/min, Säulentemperatur 35 °C. Das Injektionsvolumen und sonstige Abwandlungen der experimentellen Parameter können den jeweiligen Abbildungen entnommen werden.

Für die pufferfreien Experimente wurden die Laborproben mit einer Konzentration von 1 g/L in Wasser/Methanol = 95/5 verwendet. Für die Experimente unter Pufferzusatz hingegen enthielten beide Lösungsmittel 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure. Die Proben wurden zunächst in reinem Wasser in einer Konzentration von 1.25 g/L über Nacht unter Rühren bei 25 °C gelöst. Danach wurden den Proben die anderen Bestandteile (Methanol,  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und Essigsäure) ebenfalls gelöst in Wasser zugefügt, um die korrekten Konzentrationen aller Bestandteile zu erhalten. Die resultierenden Lösungen wurden direkt danach durch einen Spritzenvorsatzfilter (PALL, Sample Acrodisc® PSF, 25 mm, GxF/0.45 µm, PVDF Membrane) filtriert. Die technischen Proben sowie die Probenmischung Rad 79 + Rad 80 (w/w = 1/1) wurden ebenfalls über Nacht unter Rühren bei 25 °C in einer Gesamtkonzentration von 1.25 g/L jedoch in reinem Wasser gelöst und analog filtriert.

Bei den Experimenten unter Pufferzusatz wurden die folgenden Konzentrationen der Pufferbestandteile im Eluenten verwendet: 100 mmol/L Ammoniumacetat und 5 mmol/L (pH = 6.06), 100 mmol/L (pH = 4.76), 166 mmol/L (pH = 4.54), 446 mmol/L (pH = 4.10), 2000 mmol/L (pH = 3.46) Essigsäure. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurde der Puffer beiden Eluentenbestandteilen (Wasser und Methanol) in gleicher Konzentration zugesetzt. Die Reproduzierbarkeit wurde jeweils durch Doppelinjektion überprüft.

Die Wiederfindungsraten nach der chromatographischen Trennung auf der Luna PFP (2) wurden nur für das pufferhaltige System mittels isokratischer Elution bei einer Eluentenzusammensetzung Wasser/Methanol = 65/35 (v/v) (die beiden Lösungsmittel enthielten 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure bei pH = 4.1 der wässrigen Lösung) analog zu den Wiederfindungsratenbestimmung auf der SEC-Säule ermittelt.

Die Abhängigkeiten des ELSD-Signals von DS und Molmasse wurden ohne Säule durch isokratische Elution unter Verwendung einer Eluentenzusammensetzung Wasser/Methanol = 95/5 (v/v) (die beiden Lösungsmittel enthielten 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure bei  $\text{pH} = 4.1$  der wässrigen Lösung) wie folgt ermittelt: 10  $\mu\text{L}$  der Probe, gelöst mit einer Konzentration von 1g/L im Eluent wurden in das chromatographische System injiziert. Die Proben waren unfiltriert, um die Konzentrationen nicht durch Fitrationsverluste zu verfälschen. Die ELSD-Signale, die für Proben mit unterschiedlichen DS-Werten bzw. Molmassen resultierten, wurden miteinander verglichen. Die Abhängigkeit des ELSD-Signals von der Eluentenzusammensetzung wurde ebenfalls mittels isokratischer Elution ohne Säule untersucht. Hierzu wurden die folgenden Eluentenzusammensetzungen verwendet: Wasser/Methanol = 95/5, 88.5/11.5, 87/13, 85.5/14.5, 65/35 für Avicel 3 und bei Wasser/Methanol = 95/5, 87/13, 86.2/13.8, 83.9/16.1, 65/35 für BWL 3. Die beiden Lösungsmittel enthielten 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure bei  $\text{pH} = 4.1$  der wässrigen Lösung. Für diese Experimente wurden die Proben mit 0.5 g/L im jeweiligen Eluenten gelöst. Die Injektionsvolumen lagen bei 50 und 70  $\mu\text{L}$ . Die ELSD-Signale, die in unterschiedlichen Eluenten resultieren, wurden miteinander verglichen.

#### 6.4 HPLC nach vollständigem Kettenabbau

##### *Standardhydrolyse*

In einem offenen Schnappdeckelglas wurden 25 mg der Probe mit 0.5 mL 70 Vol% Perchlorsäure 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 5 mL Wasser zugegeben und die Lösung bei 120 °C 1 h gerührt. Während dieser Zeit wurden etwa 3 mL Wasser zugefügt um den Flüssigkeitsstand annähernd konstant zu halten. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 M wässriger KOH-Lösung neutralisiert (etwa 8 mL). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 2 h stehen gelassen damit sich der gebildete Niederschlag absetzen kann. Daraufhin wurde die überstehende Lösung filtriert (Spritzenvorsatzfilter, PALL, Sample Acrodisc® PSF, 25 mm, GxF / 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF Membran). Das Filtrat wurde dann bei 90 °C auf ca. 5-6 mL eingengt, 2 h stehen gelassen und anschließend erneut filtriert. Die resultierende Lösung wurde für die anschließenden chromatographischen Trennungen verwendet.

Die chromatographischen Trennungen wurden auf dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Agilent 1100 HPLC System durchgeführt.

*Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse durch SEC*

Ein ELS-Detektor (siehe Kapitel 6.3) wurde verwendet. Die Injektionsvolumen sowie Probenkonzentrationen können den jeweiligen Abbildungen entnommen werden. Die anderen chromatographischen Bedingungen sind im Kapitel 6.2 beschrieben.

*Trennung der Hydrolysate mittels Anionenaustauschchromatographie*

Eine Anionenaustauschersäule Nucleosil SB (Partikeldurchmesser 5  $\mu\text{m}$ , Porendurchmesser 100 Å, Säulendimensionen 250 x 4.6 mm, Macherey – Nagel, Düren, Deutschland), betrieben bei 35 °C, wurde als stationäre Phase verwendet. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Trennung erfolgte in einem linearen Gradienten von  $\text{H}_2\text{O}$  nach  $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OAc}$  (1 M) = 3/97 in 23 min. Das verwendete Injektionsvolumen kann den jeweiligen Abbildungen entnommen werden. Die Detektion erfolgte mittels eines Chiralitätsdetektors (Chiralyser – MP, IBZ Messtechnik, Hannover, Deutschland).

*Trennung der Hydrolysate mittels Ionenausschlusschromatographie*

Eine Kationenaustauschersäule Nucleogel Sugar 810 H (Säulendimensionen 300 x 7.8 mm, Macherey – Nagel, Düren, Deutschland) wurde bei 65°C als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase wurde 0.83 mmol/L Perchlorsäure bei 0.5 mL/min bei isokratischer Betriebsweise verwendet. Das verwendete Injektionsvolumen kann den jeweiligen Abbildungen entnommen werden. Die Detektion erfolgte mittels eines RI-Detektors (Agilent 1100, Typ G1362A, betrieben bei 35 °C), eines UV-Detektors bei 195 nm (Agilent 1100, Typ G1314A) und des Chiralitätsdetektors (Chiralyser – MP, IBZ Messtechnik, Hannover, Deutschland).

*MALDI-TOF/MS*

Die NaCMC-Hydrolysate wurden wie oben beschrieben mittels Anionenaustauschchromatographie bzw. Ionenausschlusschromatographie in ihre Bestandteile (unterschiedliche monomere CM-Glucosen) getrennt und nach manueller Fraktionierung (genaue Angabe dazu siehe Kapitel 4.3.1) direkt mittels MALDI-TOF/MS charakterisiert. Diese Untersuchungen wurden an einem Axima TOF<sup>2</sup>-Massenspektrometer (Shimadzu Biotech, Manchester, UK) durchgeführt, das mit einem gepulsten Stickstofflaser (Wellenlänge 337 nm, Pulslänge 3 ns) ausgerüstet ist. Die Beschleunigungsspannung betrug

20 kV. Die Messungen wurden im positiven linearen Reflektormodus durchgeführt. Für Kalibrierung wurde ein Polyethylenglykol-Standard mit einem gewichtsmittleren Molekulargewicht von 1460 Da in einer Konzentration 4 g/L verwendet. Die fraktionierten Proben wurden direkt auf den Edelstahlprobenträger aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Probenträger ins Massenspektrometer eingeschoben und vermessen. Die Aufnahme und die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software MALDI-TOF-MS der Firma Shimadzu Biotech.

### **6.5 Online Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie**

Für die online Kopplung der Gradientenchromatographie mit der FTIR-Spektroskopie wurde ein LC-Transform Interface Model 600xy (Lab Connections, Carrboro, USA) eingesetzt.

Die LC-Transform-Untersuchungen mit dem Agilent 1100 HPLC Instrument (siehe Kapitel 6.3) durchgeführt, wobei das Eluat des chromatographischen Laufs dabei nicht in einen der Detektoren sondern in das LC-Transform Interface geleitet wurde.

Als stationäre Phase wurde die Luna PFP (2) (siehe Kapitel 6.3) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 35°C. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 0.2 mL/min. Die Gradientenzeit betrug für den linearen Gradienten 200 min. Für den Stufengradienten wurde die Pumpe wie folgt programmiert: 0 – 15 min: isokratisch bei H<sub>2</sub>O/Methanol = 95/5 und 15.05 – 30 min: isokratisch bei H<sub>2</sub>O/Methanol = 70/30 (nur Wasser enthielt 100 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc und 446 mmol/L Essigsäure bei pH = 4.1). Die anderen experimentellen Bedingungen (Probenvorbereitung, Injektionsvolumen etc.) können den jeweiligen Abbildungen oder aus dem Kapitel 6.3 entnommen werden.

Für die FTIR-Kalibration sowie zur Untersuchung des Einflusses der Schichtdicke auf das Bandenflächenverhältnis wurden Experimente in einem Stufengradienten durchgeführt, wobei vor dem Sprühen die Trennung erst unter Verwendung des ELSDs überprüft wurde. Es wurde die Luna PFP (2) Säule bei einer Temperatur von 35 °C verwendet. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1 mL/min. Die Pumpe wurde wie folgt programmiert: 0 – 3 min: isokratisch bei H<sub>2</sub>O/Methanol = 95/5 und 3.01 – 6 min: isokratisch bei H<sub>2</sub>O/Methanol = 70/30 (nur Wasser enthielt 100 mmol/L NH<sub>4</sub>OAc und 446 mmol/L Essigsäure bei pH = 4.1). Das Injektionsvolumen betrug 100 µL. Die Probenvorbereitung ist im Kapitel 6.3 beschrieben.

Die Gasflussrate des LC Transform Probensammelmoduls betrug 30 psi. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurde aus Zeitgründen nur der Elutionsbereich der NaCMCn auf die Germaniumplatte gesprüht: im linearen Gradienten zwischen 35 min (delay time, entspricht 7 mL) und 70 min (entspricht 14 mL), im Stufengradienten zwischen 36 min (delay time, entspricht 7.2 mL) und 41 min (entspricht 8.2 mL). Die Düsentemperatur wurde im Laufe des linearen Gradienten linear von 185°C (0 min) bis 163°C (200 min) variiert. Für die Kalibration unter Verwendung des Stufengradienten wurde die Düsentemperatur ab 36 min. (entsprechend 7.2 mL) auf 185 °C und für die Untersuchungen des Einflusses der Probeninjektionsmenge auf das Bandenflächenverhältnis auf 181 °C gesetzt. Die Plattenvorschubgeschwindigkeit betrug für die linearen Gradientenexperimente und für die Untersuchungen zum Einfluss der Injektionsmenge auf das Bandenflächenverhältnis 3 mm/min, für die Kalibration unter Verwendung des Stufengradienten 1 mm/min.

Die FTIR-Spektren der chromatographischen Fraktionen wurden in 1 mm Abständen mithilfe eines Thermo Nicolet Protégé 460 FTIR Spektrometers (Thermo Electron, Waltham, USA) in der spektralen Region zwischen 700 und 4000  $\text{cm}^{-1}$  mit 32 Scans im Transmissionsmodus aufgenommen. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mittels Omnic Software Version 7.3 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA).

Die ATR (attenuated total reflectance)-FTIR-Spektren originaler Laborprobenpulver Avicel und BWL wurden an einem Thermo Nicolet NEXUS 670 FTIR Spektrometer (Thermo Electron, Waltham, USA) in der spektralen Region zwischen 700 und 4000  $\text{cm}^{-1}$  mit 32 Scans aufgenommen. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mittels Omnic Software Version 7.3 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA).

## **6.6 2D-Chromatographie von NaCMCn**

Die chromatographischen Trennungen in der ersten Dimension (Gradientenchromatographie) wurden auf dem Agilent 1100 HPLC Instrument und mit der Luna PFP (2) Säule bei 35 °C wie im Kapitel 6.3 beschrieben durchgeführt.

Für die eindimensionalen Experimente wurde ein 40 minütiger Gradient von Wasser/Methanol = 95/5 nach 65/35 (die beiden Lösungsmittel enthielten 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure bei pH = 4.1 der wässrigen Lösung) bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels ELSD 2100 (siehe Kapitel 6.3).

Für die 2D-Experimente wurde die Flussrate in der ersten Dimension auf 0.034 mL/min reduziert. Die Dauer des linearen Gradienten betrug 1000 min. Um die Gradientensteilheit zu erhalten wurde die Eluentenzusammensetzung während dieser Zeit von Wasser/Methanol = 95/5 nach 69.5/30.5 geändert (beide Lösungsmittel enthielten 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure bei pH = 4.1 der wässrigen Lösung). Das Injektionsvolumen betrug zehn Mal 100  $\mu\text{L}$ . Dabei erfolgten alle zehn Injektionen unter isokratischen Bedingungen bei einer Eluentenzusammensetzung von Wasser/Methanol = 95/5 bei einer Flussrate von 1 mL/min. Das Eluat der ersten Dimension wurde dabei nicht in die zweite Dimension überführt, sondern in den Abfall geleitet. Unmittelbar nach der zehnten Injektion wurde die Flussrate in der ersten Dimension auf 0.034 mL/min reduziert. Nachdem sich der Gegendruck in der Trennsäule stabilisierte, wurde der Gradient gestartet. Gleichzeitig wurde auch das Transferventil zwischen den beiden Trenndimensionen aktiviert, wodurch das Eluat der ersten Dimension in die zweite Dimension injiziert wurde.

Der Eluattransfer zwischen den beiden Trenndimensionen erfolgte mittels eines elektrisch gesteuerten Achtwegeventils (Typ EHMA, VICI Valco instruments, Houston, Texas, USA), welches mit zwei identischen 357  $\mu\text{L}$ -Schleifen ausgestattet war. Die Schaltintervalle betrugen für Relay 1 und Relay 2 1260 sec, für Relay 3 630 sec, die Schaltverzögerung betrug für Relay 1 und Relay 3 0 min, für Relay 2 10.5 min.

Die SEC-Trennungen in der zweiten Dimension wurden unter Verwendung einer isokratischen Pumpe Sun Flow 100 (Typ 250.100, Sun Chrom, Friedrichsdorf, Deutschland) durchgeführt. Der gleiche Säulensatz wie in Kapitel 6.2 beschrieben, wurde bei einer Flussrate von 2 mL/min und bei Raumtemperatur verwendet. Als ein isokratischer Eluent wurde die 100 mmol/L wässrige  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung verwendet. Für die Detektion wurde ein ELSD 2100 (siehe Kapitel 6.3) eingesetzt. Die Datenaufnahme und Auswertung sowie die Kontrolle des Transferventils erfolgte unter Verwendung der PSS WINGPC-Unity-Software Version 7.0 (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Deutschland).

Die Probenvorbereitung folgte der Prozedur die für die Gradientenchromatographie der Laborproben Avicel und BWL im Kapitel 6.3 beschrieben wurde, wobei die Proben in Wasser/Methanol = 95/5 (v/v), beide Lösungsmittel mit 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 446 mmol/L Essigsäure, gelöst wurden.



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Mark-Houwink-Koeffizient
A	FTIR-Bandenflächenverhältnis bei $DS = 0$ bzw. Korrekturfaktor bei der Kalibration mit breiten Standards
$A_1^-$ , $A_2^-$	Analytanionen
$A_2$	zweite Virialkoeffizient
$A_{RI}$	Gerätekonstante des RI-Detektors
Abb.	Abbildung
AGU	anhydroglucose unit
$a_s$	Skalierungsexponent
ATR-FTIR	attenuated total reflectance – fourier transform infrarot
B	FTIR-Konstante, die die DS-Abhängigkeit beschreibt bzw. Korrekturfaktor bei der Kalibration mit breiten Standards
c	Massenkonzentration
C	FTIR-Konstante, die die Probenmengenabhängigkeit beschreibt
$c_m$	Konzentration des Analyten in der mobilen Phase
$c_s$	Konzentration des Analyten in der stationären Phase
CA	Celluloseacetat
Cadoxen	Triethyldiamin-Cadmium Hydroxid
CCA	corona charged aerosol detector
$ClCH_2COONa$	Monochloressigsäure
CM-	Carboxymethyl-
CMC	Carboxymethylcellulose
$^{13}C$ -NMR	$^{13}C$ nuclear magnetic resonance
$^{13}C$ -CP/MAS-NMR	$^{13}C$ -cross polarization/magic angle spinning-nuclear magnetic resonance
$CO_2$	Kohlenstoffdioxid
2D	zweidimensional
$dn/dc$	spezifische Brechungsindexinkrement
DMAc	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	degree of polymerization
DS	degree of substitution
$\Delta DS$	DS-Intervall innerhalb von $\Delta V_R$
$DS_{w,rück}$ bzw. $DS_{rück}$	zurückberechneter gewichtsmittlerer DS
$DS_{Zeit}$	mittlerer DS bei bestimmter Elutionszeit
$DS_{klein}$ , $DS_{groß}$	Extrema der DS-Verteilung
$E^-$	Anionen der mobilen Phase
EC	Ethylcellulose
ELSD	evaporative light scattering detector
ESI-MS/MS	electrospray ionization tandem mass spectrometry
F	FTIR-Bandenfläche bzw. Peakfläche im Chromatogramm
FAB-MS	fast atom bombardment mass spectrometry
FTIR	fourier transform infrarot
$\Delta G$	Änderung der Gibbs-Energie
GC-MS	gas chromatography – mass spectrometry
Gl	Glucose
$\Delta H$	Änderung der Enthalpie
H	Wasserstoff bzw. FTIR-Bandenhöhe
$H^+$	Proton
HCl	Salzsäure
$HClO_4$	Perchlorsäure
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
$^1H$ NMR	$^1H$ nuclear magnetic resonance
HMEC	Hydroxymethylethylcellulose
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
$I_0$	Intensität des Primärstrahls

$I(\theta)$	Intensität des gestreuten Lichtes beim Streuwinkel $\theta$
$I_{\text{Zeit}}$	Chemigrammintensität bei bestimmter Elutionszeit
K	Kalium bzw. Mark-Houwink-Koeffizient bzw. optische Konstante
$\text{KClO}_4$	Kaliumperchlorat
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
$K_D$	Verteilungskoeffizient des Analyten
$K_{\text{LAC}}$	Verteilungskoeffizient des Analyten in der liquid adsorption chromatography
$K_{\text{LC-CC}}$	Verteilungskoeffizient des Analyten in der liquid chromatography at critical point of adsorption
$K_{\text{SEC}}$	Verteilungskoeffizient des Analyten in der size exclusion chromatography
LAC	liquid adsorption chromatography
LC	liquid chromatography
LC-CC	liquid chromatography at critical point of adsorption
LC-FTIR	liquid chromatography – fourier transform infrarot
LC-MS	liquid chromatography – mass spectrometry
LC-MS/MS	liquid chromatography – tandem mass spectrometry
LiCl	Lithiumchlorid
LS	light scattering
m	durchstrahlte Probenmenge
M	Molmasse
$M_w$	gewichtsmittleres Molekulargewicht
$M_{w,\text{rück}}$	zurückberechnete gewichtsmittlere Molmasse
$M_{w,\text{pull}}$	auf einer Pullulankalibrierkurve basierende gewichtsmittlere Molmasse
MALDI-TOF/MS	matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry
MALLS	multi angle laser light scattering
MC	Methylcellulose
$n_0$	Brechungsindex des Lösungsmittels bei der Wellenlänge des einfallenden Lichtes im Vakuum ( $\lambda_0$ )
$N_A$	Avogadrokonstante
Na	Natrium
NC	Nitrocellulose
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaClO}_4$	Natriumperchlorat
NaCMC	Natriumcarboxymethylcellulose
$\text{NaNO}_3$	Natriumnitrat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Ammoniumnitrat
$\text{NH}_4\text{OAc}$	Ammoniumacetat
NMR	nuclear magnetic resonance
NP	normale phase (Normalphase)
$\text{N}^+\text{R}_3$	quarternäre Ammoniumgruppen
OH	hydroxyl
$P(\theta)$	Partikelformfaktor
$P_z(\theta)$	z-Mittel des Partikelformfaktors
PFP	pentafluorophenylpropyl
Pyrolyse GC-MS	pyrolyse gas chromatography – mass spectrometry
r	Abstand zwischen dem streuenden Zentrum und Detektor
$R^2$	Regressionskoeffizient
$R(\theta)$	Rayleigh-Verhältnis bzw. Streuintensität
R-COOH	schwache organische Säure
RI	refractive index
RP	reversed phase (Umkehrphase)
$\Delta S$	Änderung der Entropie
$\langle s^2 \rangle^{1/2}$	Trägheitsradius
$\langle s^2 \rangle_z$	z-Mittel des quadratischen mittleren Trägheitsradius
SD	DS-Standardabweichung
SEC	size exclusion chromatography

SEC-MALLS	size exclusion chromatography – multi angle laser light scattering
$\text{SO}_3^-\text{H}^+$	Sulfonsäuregruppen
$S_i(\text{RI})$	RI-Detektorsignal der gerade eluierenden Fraktion
$S(V_R)$	ELSD-Signal beim bestimmten $V_R$
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
THF	Tetrahydrofuran
$V_A$	Ausschlussvolumen der Säule bzw. Zwischenkornvolumen
$V_h$	hydrodynamisches Volumen
$V_p$	Porenvolumen der stationären Phase
$\Delta V_R$	Elutionsvolumenintervall
$V_R$	Elutionsvolumen
$V_{R,\text{max}}$	Elutionsvolumen am Peakmaximum
$V_{R,\text{mc}}$	Elutionsvolumen des Meridians des Peaks
$V_{\text{stat}}$	für die Trennung aufgrund der Adsorption zugängliches Volumen der stationären Phase
UV	ultraviolet
UV/VIS	ultraviolet/visible
$w(\text{DS})$	DS-Verteilung
$\lambda_0$	Wellenlänge des einfallenden Lichtes
$v_a$ bzw. $v_s$	asymmetrische bzw. symmetrische Valenzschwingung
$\theta$	Streuwinkel
$[\eta]$	intrinsische Viskosität
$[\eta]_\theta$	intrinsische Viskosität im $\theta$ -Lösungsmittel
$\mu$	Streuvektor

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 A. H. Conner, in 'Size exclusion chromatography of cellulose and cellulose derivatives', Ed. C. Wu, Marcel Dekker, New York, 1995.
- 2 J. Heinrich, Dissertation, Universität Hamburg, 1999.
- 3 T. Heinze, K. Schwikal and S. Barthel, *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, 520.
- 4 T. Heinze, *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya Khimiy rastitel'nogo syr'ya* **2005**, 3, 13.
- 5 H. Thielking and M. Schmidt, in 'Cellulose ethers', Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- 6 B. Saake, S. Horner, T. Kruse, J. Puls, T. Liebert and T. Heinze, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 1996.
- 7 L. A. Ramos, E. Frollini and T. Heinze, *Carbohydrate Polymers* **2005**, 60, 259.
- 8 T. Heinze, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, 199, 2341.
- 9 H. C. Trivedi, C. K. Patel and R. D. Patel, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1981**, 95, 155.
- 10 R. W. Eyster, E. D. Klug and F. Diephuis, *Analytical Chemistry* **1947**, 19, 24.
- 11 R. A. Gelman, *Journal of Applied Polymer Science* **1982**, 27, 2957.
- 12 K. A. Oudhoff, F. A. Buijtenhuijs, P. H. Wijnen, P. J. Schoenmakers and W. T. Kok, *Carbohydrate Research* **2004**, 339, 1917.
- 13 F. F.-L. Ho and D. W. Klosiewicz, *Anal. Chem.* **1980**, 52, 913.
- 14 U. Kästner, H. Hoffmann, R. Dönges and J. Hilbig, *Colloids and Surfaces* **1997**, 123-124, 307.
- 15 A. Cohen, H. Schgerlöf, C. Nilsson, C. Melander, F. Tjerneld and L. Gorton, *Journal of Chromatography A* **2004**, 1029, 87.
- 16 H. M. Spurlin, *Journal of American Chemical Society* **1939**, 61, 2222.
- 17 V. Stigsson, G. Kloow and U. Germgard, *Cellulose* **2006**, 13, 705.
- 18 C. W. Hoogendam, A. d. Keizer, M. A. C. Stuart and B. H. Bijsterbosch, *Macromolecules* **1998**, 31, 6297.
- 19 W. M. Kulicke, A. H. Kull, W. Kull and H. Thielking, *Polymer* **1996**, 37, 2723.
- 20 T. E. Eremeeva and T. O. Bykova, *Carbohydrate Polymers* **1998**, 36, 319.
- 21 M. Rinaudo, J. Danhelka and M. Milas, *Carbohydrate Polymers* **1993**, 21, 1.

- 22 F. Kath, S. Lange and W. M. Kulicke, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1999**, 271, 28.
- 23 I. Sakurada, *Journal of the Society of Chemical Industry, Japan* **1938**, 31.
- 24 C. V. Francis, *Analytical Chemistry* **1953**, 25, 941.
- 25 S. N. K. Chaudhari, K. C. Gounden, G. Srinivasan and V. S. Ekkundi, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1987**, 25.
- 26 P. Käuper, W.-M. Kulicke, S. Horner, B. Saake, J. Puls, J. Kunze, H.-P. Fink, U. Heinze, T. Heinze, E.-A. Klohr and H. Thielking, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1998**, 260, 53.
- 27 A. Baar and W.-M. Kulicke, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, 195, 1483.
- 28 T. Heinze, U. Erler, I. Nehls and D. Klemm, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1994**, 215, 93.
- 29 Z. Markovic, S. Markovic and S. Zlatanovic, *Acta Agriculturae Serbica* **2007**, 7, 59.
- 30 J. Reuben and H. T. Conner, *Carbohydrate Research* **1983**, 115, 1.
- 31 E. A. Kragten, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegenthart, *Journal of Chromatography* **1992**, 623, 49.
- 32 B. Saake, S. Horner, J. Puls, T. Heinze and W. Koch, *Cellulose* **2001**, 8, 59.
- 33 S. G. Zeller, G. W. Griesgraber and G. R. Gray, *Carbohydrate Research* **1991**, 211, 41.
- 34 W. Tüting, G. Albrecht, B. Volkert and P. Mischnick, *Starch* **2004**, 56, 315.
- 35 W. Lazik, T. Heinze, K. Pfeiffer, G. Albrecht and P. Mischnick, *Journal of Applied Polymer Science* **2002**, 86, 743.
- 36 S. Horner, J. Puls, B. Saake, E.-A. Klohr and H. Thielking, *Carbohydrate Polymers* **1999**, 40, 1.
- 37 U. Heinze, J. Schaller, T. Heinze, S. Horner, B. Saake and J. Puls, *Cellulose* **2000**, 7, 161.
- 38 J. Enebro, D. Momcilovic, M. Siika-aho and S. Karlsson, *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 2173.
- 39 J. Enebro, D. Momcilovic, M. Siika-aho and S. Karlsson, *Cellulose* **2009**, 16, 271.
- 40 A. Cohen, H. Schagerlöf, C. Nilsson, C. Melander, F. Tjerneld and L. Gorton, *Journal of Chromatography A* **2004**, 1029, 87.
- 41 B. Saake, Habilitation, Universität Hamburg, 2004.

- 42 P. W. Arisz, H. J. J. Kauw and J. J. Boon, *Carbohydrate Research* **1995**, 271, 1.
- 43 P. Mischnik and R. Adden, *Macromolecular Symposia* **2008**, 262, 1.
- 44 R. Adden, R. Müller and P. Mischnick, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2006**, 207, 954.
- 45 K. Fischer, K. Krasselt, I. Schmidt and D. Weightman, *Macromol. Symp.* **2005**, 223, 109.
- 46 F. Fitzpatrick, H. Schagerlöf, T. Andersson, S. Richardson, F. Tjerneld, K.-G. Wahlund and B. Wittgren, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2909.
- 47 T. Kawai, S. Teramachi, T. Sakai and T. Hibino, *Kobunshi ronbunshu* **1997**, 54, 526.
- 48 H. O. Ghareeb and W. Radke, *Polymer* **2013**, 54, 2632.
- 49 G. Mann, J. Kunze, F. Loth and H. P. Fink, *Polymer* **1998**, 39, 3155.
- 50 G. Glöckner, 'Polymercharakterisierung durch Flüssigkeitschromatographie', VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1980.
- 51 H. Pasch and B. Trathnigg, 'HPLC of polymers', Springer-Verlag, Deutschland, 1998.
- 52 M. A. Samman, Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt, 2007.
- 53 H. Benoît, Z. Grubisic, P. Rempp, D. Decker and J. G. Zilliox, *J. Chem. Phys.* **1966**, 63, 1507.
- 54 D. Knecht, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2007.
- 55 S. Mori, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1813.
- 56 H. K. Mahabadi and K. F. O'driscoll, *Journal of Applied Polymer Science* **1977**, 21, 1283.
- 57 A. R. Weiss, *Polymer Letters* **1969**, 7, 379.
- 58 W. Radke, in 'Chromatography of polymers', Eds. K. Matyjaszewski, Y. Gnanou and L. Leibler, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- 59 P. J. Wyatt, *Analytica Chimica Acta* **1993**, 272, 1.
- 60 M. A. Bashir, A. Brüll and W. Radke, *Polymer* **2005**, 46, 3223.
- 61 Y. Brun, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1999**, 22, 3067.
- 62 I. R. Garcia and H. Pasch, *e-Polymers* **2005**.
- 63 H. Pasch, A. Deffieux, I. Henze, M. Schappacher and I. Rique-Lurbet, *Macromolecules* **1996**, 29, 8776.

- 64 W. Lee, H. Lee, H. C. Lee, D. Cho, T. Chang, A. A. Gorbunov and J. Roovers, *Macromolecules* **2002**, 35.
- 65 H. C. Lee, H. Lee, W. Lee, T. Chang and J. Roovers, *Macromolecules* **2000**, 33.
- 66 H. Pasch and K. Rode, *Polymer* **1998**, 39.
- 67 H. Pasch, E. Esser and P. Montag, *GIZ Labor-Fachzeitschrift* **1996**, 68.
- 68 J. N. Willis and L. Wheeler, in 'Use of a GPC-FTIR interface for polymer analysis', Eds. T. Provder, H. G. Barth and M. W. Urban, DC, Washington, 1995.
- 69 H. Pasch, K. Rode, C. Kloninger and E. Esser, *KGK Kautschuk Gummi Kunststoffe* **2002**, 9.
- 70 H. Pasch, *Advances in Polymer Science* **2000**, 150, 1.
- 71 J. J. Gagel and K. Biemann, *Microchimica Acta* **1988**, 2, 185.
- 72 P. Kilz, *Chromatographia* **2004**, 59, 3.
- 73 G. Glöckner, *Journal of Chromatography* **1984**, 317, 615.
- 74 J. Gerber and W. Radke, *Polymer* **2005**, 46, 9224.
- 75 X. Jiang, A. v. d. Horst, V. Lima and P. J. Schoenmakers, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1076, 51.
- 76 J. A. Raust, A. Brüll, C. Moire, C. Farcet and H. Pasch, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1203, 207.
- 77 A. Greiderer, L. Steeneken, T. Aalbers, G. Vivo-Truyols and P. Schoenmakers, *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 5787.
- 78 H. O. Ghareeb and W. Radke, *Carbohydrate Polymers* **2013**, 98, 1430.
- 79 K. Tanaka and J. S. Fritz, *Journal of Chromatography* **1986**, 361, 151.
- 80 K. Tanaka and T. Ishizuka, *Journal of Chromatography* **1979**, 174, 153.
- 81 K. Tanaka and J. S. Fritz, *Journal of Chromatography* **1987**, 409, 271.
- 82 R. P. Singhal, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1972**, 152, 800.
- 83 J. Qiu and X. Jin, *Journal of Chromatography A* **2002**, 950, 81.
- 84 J.-A. Raust, A. Brüll, C. Moire, C. Farcet and H. Pasch, *Journal of Chromatography A* **2008**, 1203, 207.
- 85 M. Melander and T. Vuorinen, *Carbohydrate Polymers* **2001**, 46, 227.
- 86 N. S. Schneider and P. Doty, *J. Phys. Chem.* **1954**, 58, 762.

- 87 G. Sitaramaiah and D. A. I. Goring, *Journal of Polymer Science* **1962**, 58, 1107.
- 88 H. J. L. Trap and J. J. Hermans, *J. Phys. Chem.* **1954**, 58, 757.
- 89 S. Mori and H. G. Barth, 'Size exclusion chromatography', Springer-Verlag, Deutschland, 1999.
- 90 T. Hofe, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2004**.
- 91 R. A. Shalliker, H. J. Catchpoole, G. R. Dennis and G. Guiochon, *BioProcess International* **2007**, 32.
- 92 W. Brown, D. Henley and J. Öhman, *Macromol. Chem.* **1963**, 62, 164.
- 93 A. J. Alpert, *Journal of Chromatography* **1990**, 499, 177.
- 94 B. Buszewski and S. Noga, *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2012**, 402, 231.
- 95 T. E. C. f. N. FTIR, in 'HR Thermo Nicolet Sampler Library', 2004.
- 96 C. O. R. Scheidl, F. Menzinger and E. J. Maier, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2009**, 81.
- 97 J. Wei and M.-Y. Ding, *Journal of Chromatography A* **2000**, 904, 113.



## **DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich beim Herrn Prof. Dr. Matthias Rehahn für die Möglichkeit am Fraunhofer Institut für Betriebsfestigkeit und Systemzuverlässigkeit LBF in der Gruppe Polymeranalytik zu promovieren.

Für die interessante Aufgabenstellung, Betreuung während der Arbeit, vielen hilfreichen Diskussionsrunden, zahlreichen Tipps, interessanten Ideen und die abschließende Korrektur der Arbeit bedanke ich mich herzlich beim Herrn Dr. Wolfgang Radke.

Für die Synthese von Modellproben und Durchführung von HPLC-Messungen danke ich Herrn Prof. Dr. Heinze, für die Synthese von technischen Proben und Viskositätsmessungen danke ich Dow Wolff Cellulosics GmbH.

Für die Durchführung von MALDI-TOF/MS Messungen danke ich Julia Beer und Karsten Rode, von ATR-FTIR-Messungen Christel Hock, von SEC-MALLS-Messungen Helena Maier, für die Durchführung von Pyrolyse GC-MS-Messungen und Diskussion der Ergebnisse Matthäus Mlynek. Julia Beer danke ich außerdem für das Korrekturlesen der Arbeit.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei allen Kollegen des ehemaligen Deutschen Kunststoff-Institutes und des jetzigen Bereiches Kunststoffe des Fraunhofer LBF.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, meinen Eltern und meinem Ehemann, für die Unterstützung während des ganzen Studiums und der Promotionszeit, Aufmunterung und Verständnis auch in schweren Zeiten bedanken.

Maria Shakun

14.03.2014

Karl-Marx-Str. 11

64646 Heppenheim

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Maria Shakun

Darmstadt, den 14.03.2014

Maria Shakun

14.03.2014

Karl-Marx-Str. 11

64646 Heppenheim

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Maria Shakun

Darmstadt, den 14.03.2014

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Maria Shakun  
Geburtsdaten: 27.08.1981 in Volozin, Weißrussland

### Ausbildung

seit 09.2009	Promotion Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Chemie/Fraunhofer Institut für Betriebsfestigkeit und Systemzuverlässigkeit LBF, Bereich Kunststoffe, Gruppe Polymeranalytik Thematik: „Neue Charakterisierungsmethoden für Natriumcarboxymethylcellulosen“
07.2008 – 01.2009	Diplomarbeit Deutsches Kunststoffinstitut, Darmstadt, Gruppe Polymeranalytik Thema: „Flüssigchromatographische Charakterisierung von Methylcellulosen, Methylhydroxyethylcellulosen und Methylhydroxypropylcellulosen“
10.2003 – 02.2009	Studium Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Chemie Abschluss als Diplom-Ingenieurin (Chemie)
09.1998 – 06.2003	Erlangen internationaler allgemeinen Hochschulreife durch Studium der deutschen Sprache und Chemie Goethe-Institut Minsk, Weißrussland, Deutsche Sprache Universität Minsk, Weißrussland, Chemie
06.1998	Erlangen allgemeiner mittleren Reife Volozin, Weißrussland

### Veröffentlichungen

- Shakun M. et al. (2013). Molar mass characterization of sodium carboxymethyl cellulose by SEC-MALLS. *Carbohydrate Polymers*, 95, 550-559.
- Shakun M. et al. (2013). Determination of the DS distribution of non-degraded sodium carboxymethyl cellulose by gradient chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 98, 943-950.
- Posterpräsentation in 6<sup>th</sup> International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-6), Thema: “Determination of DS Distribution and 1<sup>st</sup> order heterogeneity of carboxymethyl cellulose”, Dresden, Deutschland, 06-08.02.2013

*Maria Shakun*

Darmstadt, den 14. März 2014

